CARACTERIZAÇÃO, PROPRIEDADES E APLICAÇÕES DE COMPOSTOS (BIO)QUÍMICOS

Rosangela Dala Possa
Sidnei Cerqueira dos Santos
(Organizadores)

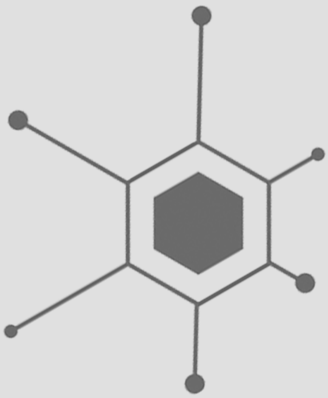
Atena
Editora
Ano 2024



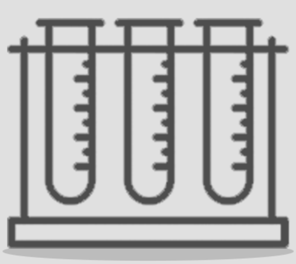


CARACTERIZAÇÃO, PROPRIEDADES E APLICAÇÕES DE COMPOSTOS (BIO)QUÍMICOS





Rosangela Dala Possa
Sidnei Cerqueira dos Santos
(Organizadores)





Atena Editora
Ano 2024

Editora chefe
Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira
Editora executiva
Natalia Oliveira
Assistente editorial
Flávia Roberta Barão
Bibliotecária
Janaina Ramos
Projeto gráfico
Ellen Andressa Kubisty
Luiza Alves Batista
Nataly Evilin Gayde
Thamires Camili Gayde
Imagens da capa
iStock
Edição de arte
Luiza Alves Batista

CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA E ENGENHARIAS

Caracterização, propriedades e aplicações de compostos (Bio)químicos

Diagramação: Ellen Andressa Kubisty
Correção: Jeniffer dos Santos
Indexação: Amanda Kelly da Costa Veiga
Revisão: Os autores
Organizadores: Rosangela Dala Possa
Sidnei Cerqueira dos Santos

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

C257 Caracterização, propriedades e aplicações de compostos (Bio)químicos / Organizadores Rosangela Dala Possa, Sidnei Cerqueira dos Santos. – Ponta Grossa - PR: Atena, 2024.

Formato: PDF
Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader
Modo de acesso: World Wide Web
Inclui bibliografia
ISBN 978-65-258-2650-9
DOI: https://doi.org/10.22533/at.ed.509242406

1. Bioquímica. I. Possa, Rosangela Dala (Organizadora). II. Santos, Sidnei Cerqueira dos (Organizador). III. Título.
CDD 572

Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná – Brasil
Telefone: +55 (42) 3323-5493
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

DECLARAÇÃO DOS AUTORES

Os autores desta obra: 1. Atestam não possuir qualquer interesse comercial que constitua um conflito de interesses em relação ao artigo científico publicado; 2. Declaram que participaram ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente na: a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão.; 3. Certificam que os artigos científicos publicados estão completamente isentos de dados e/ou resultados fraudulentos; 4. Confirmam a citação e a referência correta de todos os dados e de interpretações de dados de outras pesquisas; 5. Reconhecem terem informado todas as fontes de financiamento recebidas para a consecução da pesquisa; 6. Autorizam a edição da obra, que incluem os registros de ficha catalográfica, ISBN, DOI e demais indexadores, projeto visual e criação de capa, diagramação de miolo, assim como lançamento e divulgação da mesma conforme critérios da Atena Editora.

DECLARAÇÃO DA EDITORA

A Atena Editora declara, para os devidos fins de direito, que: 1. A presente publicação constitui apenas transferência temporária dos direitos autorais, direito sobre a publicação, inclusive não constitui responsabilidade solidária na criação dos manuscritos publicados, nos termos previstos na Lei sobre direitos autorais (Lei 9610/98), no art. 184 do Código Penal e no art. 927 do Código Civil; 2. Autoriza e incentiva os autores a assinarem contratos com repositórios institucionais, com fins exclusivos de divulgação da obra, desde que com o devido reconhecimento de autoria e edição e sem qualquer finalidade comercial; 3. Todos os e-book são *open access, desta forma* não os comercializa em seu site, sites parceiros, plataformas de *e-commerce,* ou qualquer outro meio virtual ou físico, portanto, está isenta de repasses de direitos autorais aos autores; 4. Todos os membros do conselho editorial são doutores e vinculados a instituições de ensino superior públicas, conforme recomendação da CAPES para obtenção do Qualis livro; 5. Não cede, comercializa ou autoriza a utilização dos nomes e e-mails dos autores, bem como nenhum outro dado dos mesmos, para qualquer finalidade que não o escopo da divulgação desta obra.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Inovação Tecnológica (Propit) da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará (Unifesspa);

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio ao Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ/Unifesspa) por meio dos programas: Programa de Desenvolvimento da Pós-graduação (PFPG) - Pós-Doutorado Estratégico (Edital nº 16/2022), Programa de Desenvolvimento da Pós-Graduação (PDPG) - Equipamentos na Região da Amazônia Legal, PDPG Parcerias Estratégicas nos Estados III (Capes/Fapespa) e Programa de Desenvolvimento da Pós-Graduação (Amazônia Legal);

À Fundação Amazônia de Amparo a Estudos e Pesquisas (Fapespa), pela concessão de bolsas de amparo à pesquisa e pelo fomento à pesquisa, por meio dos programas: Programa de Bolsas de Mestrado e Iniciativa Amazônia +10.

PREFÁCIO

O livro Caracterização, Propriedades e Aplicações de Compostos (Bio)Quimicos aborda diferentes experiências científicas desenvolvidas por professores e alunos do Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ) da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará (Unifesspa).

O PPGQ está inserido na área de concentração da Química e é composto por quatro linhas de pesquisas: Métodos de Análise e Química Ambiental, Química de Produtos Naturais e Biotecnologia, Química Teórica e Computacional e Química de Materiais e Nanomateriais.

A escrita deste livro se deu pela necessidade de divulgação dos trabalhos desenvolvidos no programa de forma mais acessível a comunidade acadêmica e sociedade em geral, a qual faz parte da pesquisa e muitas vezes não tem acesso ao resultado do trabalho.

O texto está estruturado em sete capítulos, onde temos as quatro linhas de pesquisa envolvidas, sendo os dois primeiros capítulos sobre a caracterização físico-química e a aplicação industrial de resíduos vegetais com capacidade adsortiva. O terceiro capítulo é sobre a análise de composto químico para armazenamento de energia. O quarto capítulo apresenta um estudo sobre a avaliação de fungos tolerantes a metais. No quinto capítulo, os pesquisadores realizaram estudos sobre compostos biológicos para o tratamento alternativo do câncer. O sexto capítulo aborda a modulação da fermentação ruminal e, para finalizar, é apresentado uso de técnicas de modelagem para estudar as propriedades do composto antidiabético fenformina.

Este livro apresenta resultados inéditos e inovadores sobre a caracterização e propriedades de compostos químicos e biológicos que possuem grande potencial para ser usados no desenvolvimento de novos produtos e processos com aplicação industrial, envolvendo as áreas da medicina, siderurgia, pecuária, energia e biorremediação.

Nesse contexto, temos o orgulho e a grata satisfação de divulgar essas pesquisas multidisciplinares e recomendar para os docentes e discentes de graduação e pós-graduação em Química, Biomedicina, Biologia, Engenharia, Farmácia, Medicina e Agronomia, bem como a sociedade em geral, a leitura e indicação do presente livro.

SUMÁRIO

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO RESÍDUO DE ACEROLA (*Malpighia emarginata* DC)

Data de aceite: 03/06/2024

Sérgio Dantas de Oliveira Júnior
Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)
Natal - Rio Grande do Norte
http://lattes.cnpq.br/4641007172823726

Jocélia Pinheiro Santos
Universidade Federal do Amazonas (UFAM)
Manaus - Amazonas
https://orcid.org/0000-0001-8428-2719

Sidnei Cerqueira dos Santos
Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará (Unifesspa)
Marabá - Pará
https://orcid.org/0000-0003-1169-256X

RESUMO: Este estudo investigou a caracterização físico-química e nutricional do resíduo de acerola (*Malpighia emarginata* DC), visando contribuir com a valorização do produto resultante após o processamento. O resíduo de acerola foi cedido por uma indústria de fruta do Rio Grande do Norte, Brasil. O resíduo foi submetido ao despolpamento mecânico, seco em estufa, triturado e caracterizado por técnicas físico-químicas tradicionais. A baixa umidade e atividade de água observadas são atributos desejáveis para aumentar a preservação e facilitar o uso do resíduo de acerola como substrato em processos fermentativos. Os resultados mostraram que a secagem em estufa é uma estratégia eficaz e que exige menos energia para converter o resíduo de acerola em matéria-prima de valor agregado, sendo indicado como potencial substrato em processos biotecnológicos.

PALAVRAS-CHAVE: Método de secagem, substrato, processos fermentativos.

PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF OVEN-DRIED ACEROLA RESIDUE (*Malpighia emarginata* DC)

ABSTRACT: This study investigated the physical-chemical and nutritional characterization of acerola residue (*Malpighia emarginata* DC), aiming to contribute to the valorization of the resulting product after processing. The acerola residue was provided by a fruit industry in Rio Grande do Norte, Brazil. The residue was subjected to mechanical pulping, dried in an oven, crushed and characterized using traditional physical-chemical techniques. The low humidity and water activity observed

are desirable attributes to increase preservation and facilitate the use of acerola residue as a substrate in fermentation processes. The results showed that oven drying is an effective strategy that requires less energy to convert acerola residue into value-added raw material, being indicated as a potential substrate in biotechnological processes.
KEYWORDS: Drying method, substrate, fermentative processes.

INTRODUÇÃO

A espécie *Malpighia emarginata* DC, conhecida popularmente como acerola, destaca-se como um dos frutos de maior cultivo no território brasileiro e possui capacidade de adaptação em diversas condições climáticas. É amplamente utilizada nas indústrias alimentícias, sendo empregada na produção de geleias, doces, sucos, entre outros, devido ao seu alto valor nutricional e riqueza em compostos bioativos. A incorporação desse fruto na dieta está associada à promoção da saúde dos consumidores, dada a sua contribuição para o aporte de nutrientes presentes nesta espécie (Alvarez-Suarez et al., 2018; Jaeschke et al., 2016; Paz et al., 2015).

Ao empregar frutas, como a acerola, na fabricação de produtos, ocorre a geração em larga escala de resíduos, resultantes das etapas de processamento dos frutos, englobando cascas, sementes, talos e bagaços. Esses resíduos apresentam elevadas concentrações de substâncias bioativas, frequentemente superiores às quantidades encontradas na polpa da fruta (Bortolotti et al., 2013; Michalska; Lysiak, 2014).

A obtenção da farinha ou pó de acerola ocorre mediante o processo de secagem da fruta *in natura* ou a partir dos subprodutos gerados na etapa de processamento. Esta abordagem se configura como uma alternativa para mitigar as perdas pós-colheita, em grande parte decorrentes da fragilidade das frutas durante a colheita e o transporte (Reis et al., 2017).

A transformação de resíduos agroindustriais, como cascas e partes dos frutos, representa uma alternativa para a valorização desses materiais, não apenas visando a obtenção de novos produtos, mas também como estratégia para mitigar impactos ambientais adversos. Dessa forma, o objetivo desse estudo concentrou-se na realização da caracterização físico-química e nutricional do resíduo de acerola (*Malpighia emarginata* DC), visando contribuir com a valorização do produto resultante após o processamento.

MATERIAL E MÉTODOS

Resíduo vegetal

O resíduo de acerola foi gentilmente doado pela indústria Delícia da Fruta, localizada em Macaíba, Rio Grande do Norte, Brasil. O fruto da acerola foi higienizado e submetido ao processo de despolpamento mecânico (Itametal, Compacta, Brasil), resultando no subproduto composto principalmente por cascas, além de polpa residual e sementes (Figura 1). O resíduo de acerola foi acondicionado em sacos de polietileno e mantido congelado a -20°C até o seu uso.



Figura 1. Etapas do despolpamento da acerola: formação da polpa e do resíduo de acerola

Fonte: Elaborada pelos autores, 2023

Condições de secagem

O processo de secagem em estufa foi conduzido a 50°C por 24 horas, utilizando uma estufa de secagem (Lucadema, LUCA-80/64, Brasil). Posteriormente, o material foi submetido à trituração em moinho de facas (Tecnal, TE-621, Brasil), e peneirados através de malha de 24 *mesh*. O pó do resíduo foi mantido em frasco de vidro protegido da luz a -20°C.

Rendimentos de secagem

Os rendimentos de secagem foram calculados como a recuperação total de sólidos após os processos de secagem, moagem e peneiramento. Os rendimentos foram definidos como a razão entre o teor de sólidos totais do resíduo de acerola seco e o teor de sólidos totais do bagaço de acerola *in natura* (Daza et al., 2016). Os resultados foram expressos em percentagem (%), como a média de três experiências de secagem independentes.

Caracterização do resíduo

Os parâmetros físico-químicos do material seco foram analisados conforme os métodos da Associação de Químicos Analíticos Oficiais (AOAC, 2006). A determinação da umidade foi realizada pelo método gravimétrico, utilizando um analisador de umidade infravermelho (BEL Engineering, M5-iThermo 163L, Itália). A atividade de água (aw) foi avaliada utilizando um higrômetro de ponto de orvalho Aqualab® série 3 TE (Decagon Devices, Pullman, EUA). O teor de cinzas foi determinado por incineração a 550°C.

O pH foi determinado utilizando um potenciômetro digital (Instrutherm, pH 2600, Brasil). A acidez total foi avaliada por meio de titulação. O teor lipídico foi determinado por extração Soxhlet com hexano. O teor total de proteína foi avaliado pelo método Kjeldahl. A determinação do teor de pectina foi conduzida por meio de extração ácida, expressa em porcentagem (%), conforme descrito por Rangana (1979).

A capacidade de retenção de água (CRA) foi determinada de acordo com Moraes et al. (2017). Após a realização do procedimento, o sobrenadante foi descartado e os sólidos restantes foram pesados. A proporção de CRA foi expressa como a massa de água retida por 1 g de amostras correspondente em base seca. A higroscopicidade foi avaliada conforme Correia et al. (2017). As amostras secas (0,5 g) foram acondicionadas em placas de Petri por 7 dias em dessecador contendo solução saturada de NaCl (UR 75,3%), à temperatura ambiente. O resultado foi expresso em porcentagem de absorção de umidade (%).

Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software Statistica 7.0 (Tibco Statistica, Palo Alto, CA, EUA). Todos os testes foram realizados em triplicata (n = 3) e os dados apresentados como média e desvio padrão (DP).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seleção do método de secagem adequado demanda atenção, visando otimizar a utilização do material residual, uma vez que diferentes processos podem influenciar nas características do produto (Correia et al., 2017).

O elevado teor de umidade presente nos bagaços de frutas (70-80%) os tornam suscetíveis à degradação microbiana e química, o que acaba prejudicando o uso dessa matéria-prima bioativa e rica em fibras. A aplicação de técnicas de secagem aplicadas aos bagaços de fruta são uma forma eficaz de reduzir a deterioração e permitir o reprocessamento dos subprodutos (Martins et al., 2018; Nóbrega et al., 2015).

O rendimento médio observado para o resíduo de acerola foi de 86,4% após o processo de secagem do material (Tabela 1). O elevado rendimento observado pode ser atribuído à natureza do resíduo de acerola, composto em grande parte por cascas de frutas e polpa residual, as quais apresentam facilidade de moagem após o processo de secagem.

O pó do resíduo de acerola apresentou baixo teor de umidade (1,58%), baixa atividade de água (0,365) e pH ácido (3,12 – 3,25) (Tabela 1), características que propiciam a preservação do produto contra reações deletérias e ataques microbianos (Nóbrega et al., 2015).

A acidez titulável teve um aumento já esperado após a secagem, o que também contribui para uma melhor preservação do pó de acerola. Esses resultados estão de acordo com os relatos de Rezende et al. (2018), usando extratos de acerola secos por pulverização, e bagaço de acerola seco em leito (Borges et al., 2016).

Análises	Resultados
Umidade (%)	1,58 ± 0,09
a_w	0,365 ± 0,01
pH	3,12 ± 0,02
AT (g ácido cítrico/ 100 g massa seca)	12,83 ± 0,04
Cinzas (%)	4,10 ± 0,04
Lipídeos (g/100 g massa seca)	3,40 ± 0,07
Proteína (g/100 g massa seca)	13,25 ± 0,03
Pectina (%)	14,09 ± 1,83
CRA (g água/g massa seca)	7,08 ± 0,17
Higroscopicidade (%)	15,59 ± 0,40

aw: atividade de água; AT: Acidez Titulável; CRA: Capacidade de retenção de água.

Tabela 1. Caracterização físico-química do resíduo de acerola

Teores significativos de cinzas e lípideos podem estar relacionados à presença de minerais, fibras insolúveis e lipídios na estrutura morfológica das cascas e sementes dos frutos (Borges et al., 2016). O alto teor de proteína encontrado no pó do resíduo de acerola (13,25 g/100 g) foi superior ao da farinha de semente de acerola (8,51 ± 0,11 g/100g) e da farinha de bagaço de acerola (11,55 ± 0,09 g/100 g) obtidos por liofilização (Marques et al., 2013).

O alto teor de pectina observado (14,09%) é um atributo desejável para aplicações biotecnológicas do bagaço de acerola desidratado, indicando seu potencial como possível substrato indutor para à produção de enzimas pectinolíticas. Os teores médios de pectina foram semelhantes aos encontrados por Souza et al. (2018) para cascas de maracujá (11–19%) e por Wikiera et al. (2016) para bagaço de maçã (10–20%).

Os resultados indicam que as amostras do resíduo de acerola possuem a capacidade de retenção de água de 7,08 ± 0,17 g água/g massa seca (Tabela 1). A CRA representa a capacidade que as amostras têm de absorver e reter água em suas estruturas (Ahmadi et al., 2019). Em geral, os resíduos agroindustriais apresentam teor significativo de fibras insolúveis, o que influencia a CRA das amostras em pó (López-Marcos et al., 2015).

Os resultados da higroscopicidade apresentados neste estudo corroboram com os relatados por Moraes et al. (2017), onde avaliaram a adição de transportadores de secagem durante a liofilização de polpa e bagaço de acerola e observaram valores semelhantes. Segundo Moraes et al. (2017), o material seco em estufa pode ser categorizado como higroscópico.

A absorção de água pelo substrato exerce influência direta no fenômeno de transferência de massa (Casciatori et al., 2015; Durand, 2003). Tanto a CRA e a higroscopicidade estão relacionadas a diferentes formas de retenção de água pelo substrato. Concomitantemente, o teor de água retido por conta do CRA preenche os espaços capilares e porosos, o que torna favorável para o uso microbiano durante o processo fermentativo (He; Chen, 2015; Yang, 1988). A aplicação de substratos higroscópicos e de alta retenção de água para a produção de enzimas celulolíticas em fermentação em estado sólido já foi descrito (Casciatori et al., 2015; Vijayaraghavan et al., 2016).

CONCLUSÃO

A secagem é uma estratégia eficaz e versátil para desenvolver formas alternativas de aproveitar matérias-primas ricas e abundantes, como resíduos e/ou bagaços de frutas. A escolha do processo de secagem deve ser baseada nos parâmetros custo-benefício e qualidade, conceito que deve considerar a aplicação alvo do subproduto. O baixo custo dos equipamentos de secagem em estufa, fácil manuseio e operação, associados à menor demanda energética, fazem da secagem em estufa uma abordagem eficaz para a exploração racional do resíduo de acerola em processos fermentativos.

Os resultados mostraram que a secagem em estufa é uma estratégia eficiente para o reprocessamento do resíduo de acerola, conciliando custo operacional mais baixo e a manutenção de características físico-químicas e nutricionais importantes do resíduo vegetal, sendo indicado como potencial substrato em processos biotecnológicos. .

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer à Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), à Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e à Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará (Unifesspa).

REFERÊNCIAS

AHMADI, S., SHEIKH-Zeinoddin, M., SOLEIMANIAN-ZAD, S., ALIHOSSEINI, F., YADAV, H. **Effects of different drying methods on the physicochemical properties and antioxidant activities of isolated acorn polysaccharides.** Lwt 100, 1–9, 2019.

ALVAREZ-SUAREZ, J. M. et al. **Guava (*Psidium guajava* L. cv. Red Suprema) Crude Extract Protect Human Dermal Fibroblasts against Cytotoxic Damage Mediated by Oxidative Stress**. Plant Foods for Human Nutrition, v. 73, p. 18-24, 2018.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of AOAC International, 20th ed**. AOAC International, Arlington, VA, 2006.

BORGES, K.C., AZEVEDO, J.C., DE FÁTIMA MEDEIROS, M., CORREIA, R.T.P. **Physicochemical characterization and bioactive value of tropical berry pomaces after spouted bed drying.** J. Food Qual. 39, 192–200, 2016.

BORTOLOTTI, C.T. et al. **Hydrodynamic study of a mixture of west indian cherry residue and soybean grains in a spoutedbed.** Canadian Journal of Chemical Engineering, v. 91, p. 1871–1880, 2013.

CASCIATORI, F.P., LAURENTINO, C.L., ZANELATO, A.I., THOMÉO, J.C. **Hygroscopic properties of solid agro-industrial by-products used in solid-state fermentation.** Ind. Crops Prod. 64, 114–123, 2015.

CORREIA, R., GRACE, M.H., ESPOSITO, D., LILA, M.A. **Wild blueberry polyphenol-protein food ingredients produced by three drying methods: Comparative physico-chemical properties, phytochemical content, and stability during storage.** Food Chem. 235, 76–85, 2017.

DAZA, L.D., FUJITA, A., FÁVARO-TRINDADE, C.S., RODRIGUES-RACT, J.N., GRANATO, D., GENOVESE, M.I. **Effect of spray drying conditions on the physical properties of Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) fruit extracts.** Food Bioprod. Process. 97, 20–29, 2016.

DURAND, A. **Bioreactos design for solid state fermentation.** Biochem. Eng. J. 13, 113–125, 2003.

HE, Q., CHEN, H.Z. **Comparative study on occurrence characteristics of matrix water in static and gas double-dynamic solid-state fermentations using low-field NMR and MRI.** Anal. Bioanal. Chem. 407, 9115–9123, 2015.

JAESCHKE, D. P.; MARCZAK, L. D. F.; MERCALI, G. D. **Evaluation of non-thermal effects of electricity on ascorbic acid and carotenoid degradation in acerola pulp during ohmic heating.** Food Chemistry, v. 199, p. 128–134, 2016.

LÓPEZ-MARCOS, M.C., BAILINA, C., VIUDA-MARTOS, M., PÉREZ-ALVAREZ, J.A., FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. **Properties of Dietary Fibers from Agroindustrial Coproducts as Source for Fiber-Enriched Foods.** Food Bioprocess Technol. 8, 2400–2408, 2015.

MARQUES, T.R., CORRÊA, A.D., LINO, J.B. DOS R., ABREU, C.M.P. DE, SIMÃO, A.A. **Chemical constituents and technological functional properties of acerola (*Malpighia emarginata* DC.) waste flour.** Food Sci. Technol. 33, 526–531, 2013.

MARTINS, M.D., GUIMARÃES, M.W., DE LIMA, V.A., GAGLIOTI, A.L., DA-SILVA, P.R., KADOWAKI, M.K., KNOB, A. **Valorization of passion fruit peel by-product: Xylanase production and its potential as bleaching agent for kraft pulp.** Biocatal. Agric. Biotechnol. 16, 172–180, 2018.

MICHALSKA, A.; ŁYSIAK, G. **Przydatność do suszenia owoców śliw uprawianych w Polsce w aspekcie przemian związków bioaktywnych i tworzących się produktów reakcji Maillarda.** Żywność Nauka Technologia Jakość, v. 21, p. 29-38, 2014.

PAZ, M., et al. **Brazilian fruit pulps as functional foods and additives: Evaluation of bioactive compounds.** Food Chemistry, 172, 462-468, 2015.

REIS, D. S.; FIGUEIREDO N. A.; FERRAZ, A. D. V.; FREITAS, S. T. **Produção e estabilidade de conservação de farinha de acerola desidratada em diferentes temperaturas.** Embrapa Semiárido-Artigo em periódico indexado, 2017.

MORAES, F.P. DE, GONÇALVES, A.C., MIGUEL, T.B.V., BORGES, K.C., CORREIA, R.T.P. **Freeze Dried Acerola (*Malpighia emarginata*) Pulp and Pomace: Physicochemical Attributes, Phytochemical Content and Stability during Storage 1**, 2017.

NÓBREGA, E.M., OLIVEIRA, E.L., GENOVESE, M.I., CORREIA, R.T.P. **The impact of hot air drying on the physical-chemical characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity of acerola (*Malphigia emarginata*) residue. J.** Food Process, 2015.

RANGANA, S. **Manual of analysis of fruit and vegetable products. New Delhi:** Tata McGraw Hill Publ, 1979.

REZENDE, Y.R.R.S., NOGUEIRA, J.P., NARAIN, N. **Microencapsulation of extracts of bioactive compounds obtained from acerola (*Malpighia emarginata* DC) pulp and residue by spray and freeze drying: Chemical, morphological and chemometric characterization.** Food Chem. 254, 281–291, 2018.

SOUZA, C.B. DE, JONATHAN, M., ISAY SAAD, S.M., SCHOLS, H.A., VENEMA, K., 2018. **Characterization and in vitro digestibility of by-products from Brazilian food industry: Cassava bagasse, orange bagasse and passion fruit peel.** Bioact. Carbohydrates Diet. Fibre 1–10, 2018.

VIJAYARAGHAVAN, P., PRAKASH VINCENT, S.G., DHILLON, G.S. **Solid-substrate bioprocessing of cow dung for the production of carboxymethyl cellulase by Bacillus halodurans IND18.** Waste Manag. 48, 513–520, 2016.

WIKIERA, A., MIKA, M., STARZYŃSKA-JANISZEWSKA, A., STODOLAK, B. **Endo-xylanase and endo-cellulase-assisted extraction of pectin from apple pomace.** Carbohydr. Polym. 142, 199–205, 2016.

YANG, S. **Protein enrichment of sweet potato residue with amylolytic yeasts by solid-state fermentation.** Biotechnol. Bioeng. 32, 886–890, 1988.

CAPÍTULO 2

SÍNTESE DE FERRITAS POR ROTA SOL-GEL PROTEICO VOLTADAS AO ARMAZENAMENTO DE ENERGIA

Data de aceite: 03/06/2024

Emilly Cruz da Silva
Laboratório de Eletroquímica e Energia (LEEN), Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas (UFAM)
Manaus - Amazonas
https://orcid.org/0000-0001-9755-4875

Sidnei Cerqueira Dos Santos
Laboratório de Bioensaios e Bioprocesos (L@βio), Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará (Unifesspa)
Marabá - Pará
https://orcid.org/0000-0003-1169-256X

Leandro Aparecido Pocrifka
Laboratório de Eletroquímica e Energia (LEEN), Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas (UFAM)
Manaus - Amazonas
https://orcid.org/0000-0003-1156-0196

RESUMO: Com o avanço das indústrias e as ações antropogênicas, tornaram-se incontáveis as preocupações quanto aos recursos voltados à geração e ao armazenamento de energia. Dessa forma, cientistas têm colaborado na produção de materiais eficientes para o armazenamento de energia. Este trabalho teve como objetivo sintetizar e caracterizar as nanopartículas magnéticas de ferritas de cobalto e níquel pela rota sol gel proteico para aplicação em eletrodos, como dispositivos de armazenamento de energia. A síntese das ferritas de $CoFe_2O_4$ e $NiFe_2O_4$ foi realizada com gelatina comercial e sais de ferro e níquel, respectivamente, seguida por calcinação a 500ºC por 2 horas. Estudos físicos, morfológicos e estruturais foram realizados para caracterizar as propriedades das nanopartículas de ferritas e dos eletrodos produzidos com estes óxidos. Os resultados do padrão de DRX confirmaram a formação das ferritas. A análise de microscopia eletrônica de varredura mostrou que as nanopartículas de ferrita exibem uma estrutura porosa, formada por uma morfologia hexagonal. Além disso, as histereses magnéticas para ambos os materiais comprovam a suscetibilidade magnética. Foi possível observar que a síntese sol-gel, somada ao processo de calcinação, resultou em materiais mais cristalinos e melhor organizados. Estas características revelam capacidade de 82,58 mA h g^{-1} para o eletrodo de $NiFe_2O_4$, comparado com a 100,08 mA h g^{-1} obtidos pelo eletrodo de $CoFe_2O_4$.

PALAVRAS-CHAVE: Energia limpa, eletrodo, nanopartículas de cobalto e níquel

SYNTHESIS OF FERRITES BY PROTEIN SOL-GEL ROUTE FOR ENERGY STORAGE

ABSTRACT: With the advancement of industries and anthropogenic actions, concerns regarding the resources aimed at generating and storing energy have become countless. In this way, scientists have collaborated in the production of efficient materials for energy storage. This work aimed to synthesize and characterize cobalt and nickel ferrite nanoparticles via the protein sol gel route for application in electrodes, such as energy storage devices. The synthesis of CoFe2O4 and NiFe2O4 ferrites was carried out with commercial gelatin and iron and nickel salts, respectively, followed by calcination at 500ºC for 2 hours. Physical, morphological, and structural studies were carried out to characterize the properties of ferrite nanoparticles and electrodes produced with these oxides. The XRD pattern results confirmed the formation of ferrites. Scanning electron microscopy analysis showed that the ferrite nanoparticles exhibit a porous structure, formed by a hexagonal morphology. Furthermore, the magnetic hysteresis for both materials proves the magnetic susceptibility. It was possible to observe that the sol-gel synthesis, added to the calcination process, resulted in more crystalline and better organized materials. These characteristics reveal a capacity of 82.58 mA h g-1 for the NiFe2O4 electrode, compared to 100.08 mA h g-1 obtained by the CoFe2O4 electrode.

KEYWORDS: Clean energy, electrode, cobalt and nickel nanoparticles

INTRODUÇÃO

Os recursos energéticos renováveis sofrem a previsão de não-suprimento da demanda global vindoura (Smdani et al., 2023),tornando-se necessário o desenvolvimento sustentável de materiais voltados à geração e armazenamento de energia, como os dispositivos de armazenamento de energia (DAE).

Dispositivos de armazenamento de energia são compostos por materiais que, devido a todas as suas propriedades, podem armazenar uma determinada quantidade de energia para que seja utilizada em outras aplicações posteriores (Dubal et al., 2015). Os DAE podem ser aplicados em várias áreas, por exemplo, na confecção de eletrônicos portáteis, roupas e no setor de transporte, devido a sua alta ciclabilidade, longa vida útil e ao baixo custo de produção (Chen et al., 2018).

Os sistemas de armazenamento apresentam diferentes classificações: mecânico, químico, elétrico e eletroquímico. O sistema mecânico atualmente é o método dominante de armazenamento, no entanto, os capacitores eletroquímicos e baterias têm demonstrado grande potencial. Dentre os materiais utilizados para o armazenamento de energia, nanomateriais baseados em óxidos têm sido prepostos como materiais de eletrodo em vários sistemas eletroquímicos, isso acontece em razão de sua alta condutividade eletrônica, grande área superficial e inércia química (Jiang et al., 2012).

Existem diversas rotas de sínteses que podem ser aplicadas para preparar materiais com as características necessárias no ramo de energia, como as sínteses inorgânica,

hidrotermal e Pechini, e o método de combustão. No entanto, uma vez que buscamos somar aos preceitos da química verde, é necessário também visar meios menos agressivos de produzir o material. Surge assim o método de síntese sol-gel proteico, que apresenta valor de custo relativamente mais baixo do que os citados anteriormente e eficiência equiparável quanto a rendimentos e qualidade do material formado (Silva et al., 2018). O sol-gel é um processo químico utilizado para síntese de uma suspensão coloidal de partículas sólidas em um líquido e que, sequencialmente, gera a formação de um material de fase mista composta por um sólido ocupado por um solvente em gel (da Silva et al., 2020).

Muitos trabalhos realizam essa síntese com precursores metálicos, dissolvidos em solução aquosa básica ou ácida dependendo da finalidade desejada. O agente quelante dessa reação normalmente é suprido com um composto de estrutura proteica como o ágar-ágar, a água de coco e a gelatina comercial. Como esperado, a estabilidade química é encontrada facilmente em óxidos de metais preciosos que geralmente são caros no mercado, portanto, há necessidade de materiais mais baratos, menos tóxicos e mais estáveis. Os óxidos de metais de transição têm sido amplamente estudados como material de eletrodo de pseudocapacitores, devido às suas propriedades, como alta área superficial, porosidade e estabilidade (El-Shafai et al., 2023; Sivakumar et al., 2021).

Diante do exposto, é extremamente viável aplicar o método sol-gel para que seja possível gerar um óxido metálico misto, com características controladas por meio do uso da temperatura de decomposição térmica. As principais vantagens do processamento sol-gel para aplicações ópticas e eletrônicas são: (i) temperatura ambiente da preparação do sol e processamento do gel; (ii) homogeneidade do produto; (iii) baixa temperatura de síntese; (iv) facilidade de fabricação de materiais multicomponentes; e (v) controle sobre o tamanho e a forma das partículas de pó, bem como a distribuição de tamanhos. Dessa forma, esse trabalho teve como objetivo sintetizar e caracterizar as nanopartículas magnéticas de ferritas de cobalto e níquel pela rota sol gel proteico para aplicação em eletrodos, como dispositivos de armazenamento de energia.

MATERIAIS E MÉTODOS

Síntese dos óxidos

Para a síntese de ferrita de cobalto ($CoFe_2O_4$), foi adicionado 1 g de gelatina comercial sem sabor, 0.5 g de $CoCl_2.6H_2O$ e 0.5 g de $FeCl_2.6H_2O$ (Sigma Aldrich), em 200 mL de água destilada, e 20 mL de solução de KOH ($1 mol.L^{-1}$) para possibilitar a hidrólise da solução, o método foi adaptado de Silva et al. (2018). O procedimento foi o mesmo para o preparo de ferrita de níquel ($NiFe_2O_4$), porém, utilizando 0.5 g do sal de $NiCl_2.6H_2O$. Esta mistura foi homogeneizada em temperatura de aproximadamente 50ºC em constante agitação, durante 50 minutos. O material foi seco em uma estufa à temperatura de aproximadamente 100°C durante 24 horas, em seguida, foi realizada a etapa de calcinação a 500°C por 2 horas (Figura 1).

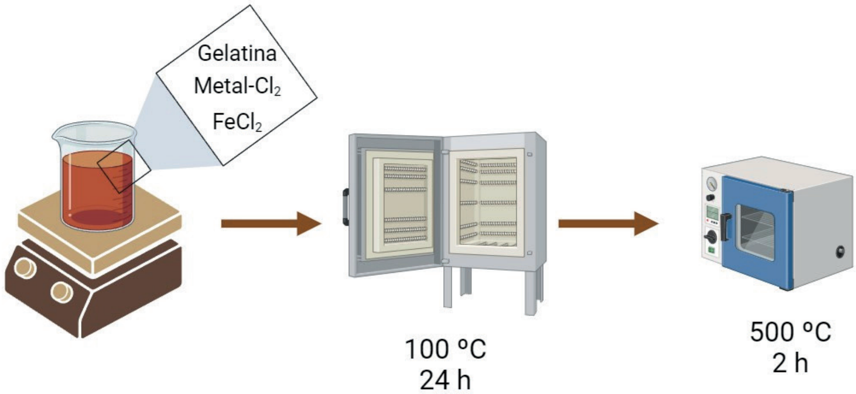


Figura 1. Procedimento experimental para obtenção das ferritas.

Preparo dos eletrodos

Para o preparo dos eletrodos, foi utilizado um substrato metálico de aço inox 304, nas medidas de 1,0 cm x 0,5 cm, previamente tratado por jateamento de sílica para remoção de impurezas. Os substratos foram lavados com água fervente, sonicados com álcool etílico e secos em estufa a 100°C por 2 horas. A tinta para o processo de deposição no eletrodo foi preparada na proporção 70:20:10 de material ativo ($NiFe_2O_4$ ou $CoFe_2O_4$), material condutor (Carbono Vulcan) e aglutinante (Nafion) em meio alcoólico, respectivamente, com o auxílio do banho ultrassônico. Foram preparados, para cada temperatura de síntese, 24 eletrodos para realização das triplicatas.

Técnicas de caracterização

Os óxidos obtidos foram caracterizados por difração de Raios-X, usando o X-Ray (Shimadzu, XRD 7000) e CuKα (λ = 1.54056 Å), com tamanho de passo de 0,05° e tempo de varredura de 2 s por passo. As propriedades magnéticas das nanopartículas sintetizadas foram medidas usando o VSM (Lakeshore), à temperatura ambiente e com ciclo de histerese desenhado com o campo magnético alternando entre -20000 G a 20000 G.

A caracterização morfológica dos óxidos foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), modelo Vega3 Tescan. A preparação da amostra foi realizada a partir do depósito do pó calcinado em uma placa de silício, fixada a um suporte de alumínio. A amostra foi previamente metalizada em um equipamento de pulverização de ouro (SCD 050, Bal-Tec). Os voltamogramas cíclicos (VC) foram realizados em uma faixa de potencial entre -1,3 e -0,3 V em diferentes taxas de varredura, variando de 5 a 50 mV s^{-1}. Os ciclos de carga de descarga galvanostática (CDG) foram registrados em uma faixa de

potencial de -1,0 a 0,0 V, com densidade de corrente de 1 A g^{-1}, para calcular a capacidade específica dos eletrodos. Os espectros de eletroquímica de impedância foram coletados na faixa de frequências de 0,1 a 10.000 Hz em 10 mV. Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas usando um potenciostato Autolab (PGSTAT, 302 N). A capacitância por voltametria cíclica foi calculada pela equação abaixo:

$$C = \int \frac{Q}{\Delta \mathrm{E}\,.\,\mathrm{m}}$$

Onde C, é a capacitância dada em mAh g^{-1}, Q, é a carga voltamétrica (C) e ΔE é a janela do potencial em (V).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os difratogramas das amostras de $CoFe_2O_4$ e $NiFe_2O_4$, tratadas a temperatura de 500ºC, apresentaram picos estreitos e intensos (Figura 2A), que caracterizam maior cristalinidade nos materiais. Com o auxílio do software Mercury, foi identificada a presença da fase cristalina da ferrita de cobalto ($CoFe_2O_4$ - JCPDS 22-1086) e a fase cristalina da ferrita de níquel ($NiFe_2O_4$ - JCPDS 10-0325). As constantes de rede calculadas foram 8.481 Å para $CoFe_2O_4$ e 8,332 Å para $NiFe_2O_4$. Estes resultados estão de acordo com os padrões observados por Manohar *et al*. (2019), confirmando a obtenção de ferritas nanoestruturadas na forma de espinélio. Além disso, é importante salientar a ausência perceptível de fases de impureza nestes difratogramas, indicando alta porcentagem de pureza dos óxidos sintetizados.

Neste estudo, o óxido $CoFe_2O_4$ apresentou maior cristalinidade. Por meio da equação de Scherrer, o tamanho de cristalito do $CoFe_2O_4$ encontrado foi de 31 nm para o plano (3 1 1), referente ao pico mais intenso. Para o $NiFe_2O_4$, nas mesmas condições, o valor encontrado foi de 42 nm. Esses dados são relacionados a área superficial dos óxidos, observando que a menor área superficial é muito benéfica para o armazenamento de energia.

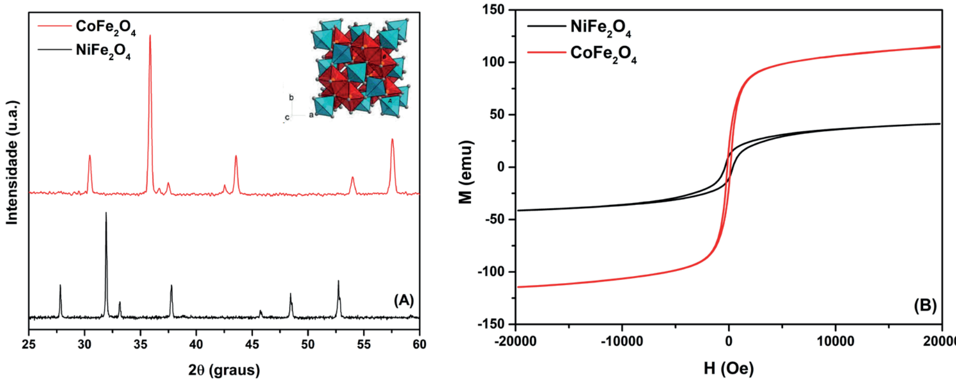


Figura 2. (A) Difratogramas e (B) Histereses magnéticas dos óxidos $CoFe_2O_4$ e $NiFe_2O_4$ depositados nos eletrodos.

A Figura 2(B) apresenta as histereses magnéticas para o conjunto de amostras de ferrita em pó. Através das medidas de magnetização, foi possível observar que os óxidos foram ferrimagnéticos do tipo duro, devido ao elevado valor de magnetização de saturação, 134 emu/cm^3 para $CoFe_2O_4$ e 48 emu/cm^3 para $NiFe_2O_4$, mostrando que o óxido $CoFe_2O_4$ apresenta maior suscetibilidade magnética.

Sabe-se que a principal característica de ferritas, materiais ferrimagnéticos, é a suscetibilidade magnética. Essa grandeza física tem relação com a permissividade do óxido a um determinado campo magnético, podendo também ser extrapolado para uma maior interação com campos elétricos e, até mesmo, causar aumento da difusão entre as partículas, favorecendo aplicações como materiais de armazenamento de energia(Kennedy et al., 2018).

As estruturas do óxido $NiFe_2O_4$ (Figura 3A) e do $CoFe_2O_4$ (Figura 3B) obtidas por MEV exibiram uma organização morfológica hexagonal, corroborando com Sivakumar et al. (2021). Além disso, foi possível observar nas microestruturas que o óxido de $CoFe_2O_4$ se organiza melhor na superfície do que o $NiFe_2O_4$, isso ocorre devido ao seu menor tamanho cristalino. Entende-se que materiais estruturalmente melhorados sejam benéficos para a interação com o eletrólito, levando em consideração que reações eletroquímicas são aprimoradas a partir da interação do material com o eletrólito, seja ele salino, básico ou ácido(Yang et al., 2016).

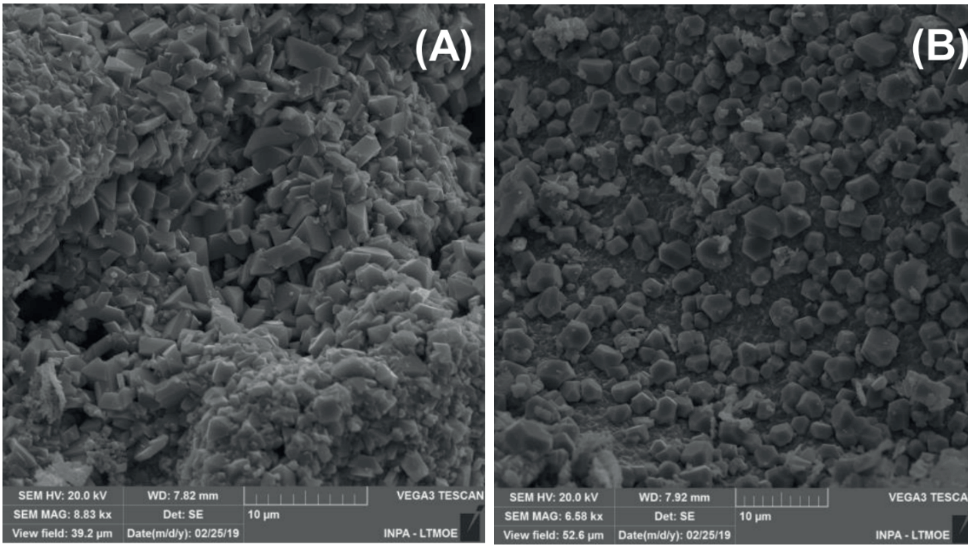


Figura 3. Microscopia eletrônica de varredura dos óxidos (A) $NiFe_2O_4$ e (B) $Cofe_2O_4$. Magnificação de 10 μm.

Os perfis dos voltamogramas referentes aos óxidos $NiFe_2O_4$ e $CoFe_2O_4$ estão apresentados na Figura 4 (A e B). Os voltamogramas são levemente distintos para Ni e Co, com picos de oxidação e redução em -1,00 e 0,52 V e em -1,02 e 0,58 V, respectivamente.

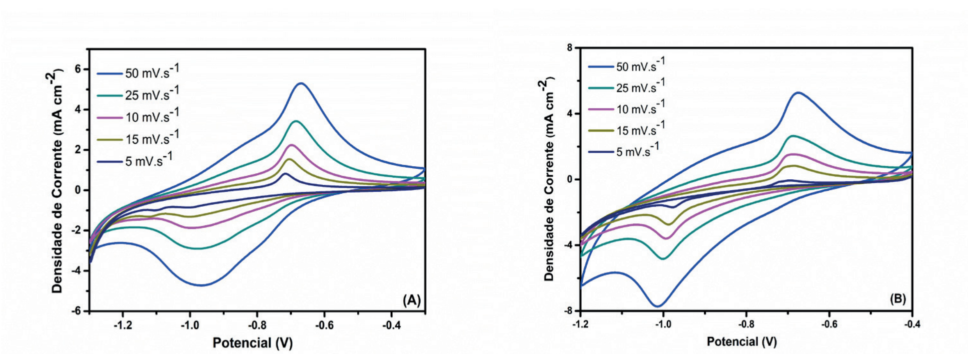


Figura 4. Curvas de voltametria cíclica realizadas no eletrólito de KOH 1M, em diferentes velocidades de varredura para os eletrodos de (A) $NiFe_2O_4$ e (B) $CoFe_2O_4$.

O comportamento de ambos os eletrodos indica um armazenamento do tipo pseudocapacitor (Costa et al., 2020). O efeito de polarização do eletrodo do material em altas taxas aconteceu devido ao deslocamento dos picos com o aumento da taxa de varredura. O pico de redução corresponde à reação de conversão de Fe^{3+} e Ni^{2+}, e o pico de oxidação foi atribuído à oxidação de Fe e Ni para Fe^{3+} e Ni^{2+}, respectivamente, podendo ser deduzido para Fe e Co no segundo eletrodo. Utilizando a taxa de 25 $mV.s^{-1}$, foi possível observar que o eletrodo de $NiFe_2O_4$ apresentou 82,58 mA h g^{-1} comparado a 100,08 mA h g^{-1} do $CoFe_2O_4$, mostrando a capacidade de armazenamento superior da ferrita de cobalto, devido sua maior suscetibilidade magnética e menor área superficial.

As curvas de carga e descarga galvanostática dos eletrodos de $NiFe_2O_4$ e $CoFe_2O_4$ estão apresentadas na Figura 5(A). Os resultados de capacidade obtidos foram 6,74 e 18,58 mA h g-1 para os óxidos $NiFe_2O_4$ e $CoFe_2O_4$, respectivamente. Estes dados corroboram com os observados na voltametria cíclica.

Através da análise dos gráficos de Nyquist, foram observados desempenho capacitivo para $NiFe_2O_4$ e $CoFe_2O_4$ (Figura 5B), com diferentes comportamentos e determinadas particularidades. O eletrodo contendo $NiFe_2O_4$ demonstra uma maior resistência de transferência de carga na região de alta frequência.

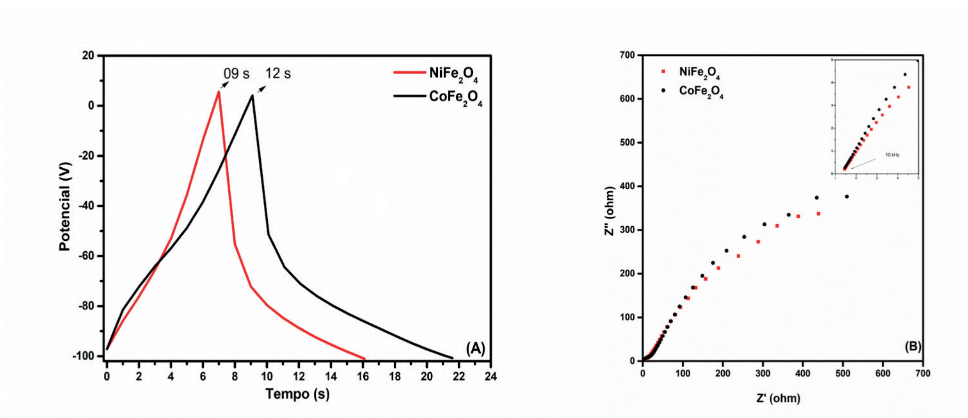


Figura 5. (A) Curvas de carga de descarga galvanostática realizadas no eletrólito de KOH 1M, em densidade de corrente de 1 A g^{-1}, para os eletrodos de $NiFe_2O_4$ e $CoFe_2O_4$; (B) Gráfico de Nyquist (-Z" vs. Z') para os eletrodos de $NiFe_2O_4$ e $CoFe_2O_4$ em solução de KOH 1 M.

Apesar de demonstrar comportamentos capacitivos, os óxidos apresentaram diferentes inclinações por Nyquist, devido à diferença no nível de cristalinidade visto nas caracterizações anteriores. As caracterizações e aplicações dos nanomateriais mostram que suas propriedades físicas são importantíssimas para a aplicação como pseudocapacitores. Tais características resultaram em uma resposta de capacidade de 82,58 mA h g-1 de $NiFe_2O_4$, comparado a 100,08 mA h g-1 do $CoFe_2O_4$.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo das nanopartículas magnéticas de ferritas via rota sol gel proteico demonstrou que o óxido ferrimagnético de cobalto apresentou o melhor desempenho para aplicação em eletrodos, devido suas propriedades atenuadas. Esta pesquisa não só mostra a possibilidade de produzir ferritas através de uma rota mais simples e ecológica, como também estuda a obtenção de materiais com a estabilidade necessária para um bom desempenho como pseudocapacitor e a influência que as propriedades físicas têm sobre a resposta eletroquímica de diferentes óxidos. Dessa forma, este trabalho gerou informações importantes para subsidiar novas pesquisas científicas e tecnológicas envolvendo o uso de óxidos para o desenvolvimento de eletrodos.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer à instituição brasileira de financiamento à pesquisa FAPEAM pelo apoio. Agradecemos ao Laboratório Temático de Microscopia Óptica e Eletrônica (INPA) pelas imagens MEV. Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001.

REFERÊNCIAS

Chen, H., Ling, M., Hencz, L., Ling, H.Y., Li, G., Lin, Z., Liu, G., Zhang, S., 2018. Exploring Chemical, Mechanical, and Electrical Functionalities of Binders for Advanced Energy-Storage Devices. Chem Rev 118, 8936–8982. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00241

Costa, J.C.M., Nascimento, M.C., Silva, E.C., Pereira, B.L., Passos, R.R., Pocrifka, L.A., 2020. Galvanostatic synthesis of MnO2 in carbon cloth: an electrochemical impedance spectroscopy study. Journal of Solid State Electrochemistry 24, 1727–1733. https://doi.org/10.1007/s10008-020-04532-2

da Silva, E., de Moraes, M., Brito, W., Passos, R., Brambilla, R., da Costa, L., Pocrifka, L., 2020. Synthesis of ZnO Nanoparticles by the Sol-Gel Protein Route: A Viable and Efficient Method for Photocatalytic Degradation of Methylene Blue and Ibuprofen. J Braz Chem Soc. https://doi.org/10.21577/0103-5053.20200050

Dubal, D.P., Ayyad, O., Ruiz, V., Gómez-Romero, P., 2015. Hybrid energy storage: the merging of battery and supercapacitor chemistries. Chem Soc Rev 44, 1777–1790. https://doi.org/10.1039/C4CS00266K

El-Shafai, N.M., Alamrani, N.A., Al-bonayan, A.M., Abu-Melha, S., El-Metwaly, N.M., El-Mehasseb, I., 2023. Building electrons clouds of redesigned copper oxide nanorods captured on the graphene oxide surface for supercapacitors and energy storage. Surfaces and Interfaces 38, 102757. https://doi.org/10.1016/j.surfin.2023.102757

Jiang, J., Li, Y., Liu, J., Huang, X., Yuan, C., Lou, X.W.D., 2012. Recent Advances in Metal Oxide-based Electrode Architecture Design for Electrochemical Energy Storage. Advanced Materials 24, 5166–5180. https://doi.org/10.1002/adma.201202146

Kennedy, S., Roco, C., Déléris, A., Spoerri, P., Cezar, C., Weaver, J., Vandenburgh, H., Mooney, D., 2018. Improved magnetic regulation of delivery profiles from ferrogels. Biomaterials 161, 179–189. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.01.049

Silva, R.M., Raimundo, R.A., Fernandes, W. V., Torres, S.M., Silva, V.D., Grilo, J.P.F., Morales, M.A., Macedo, D.A., 2018. Proteic sol-gel synthesis, structure and magnetic properties of Ni/NiO core-shell powders. Ceram Int 44, 6152–6156. https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2017.12.248

Sivakumar, N., Nagaraju, P., Alsalme, A., Alghamdi, A., Jayavel, R., 2021. Enhanced electrochemical performance of lanthanum ferrite decorated reduced graphene oxide nanocomposite electrodes prepared by in situ microwave irradiation for energy storage applications. Int J Energy Res 45, 5272–5282. https://doi.org/10.1002/er.6146

Smdani, G., Islam, M.R., Ahmad Yahaya, A.N., Bin Safie, S.I., 2023. PERFORMANCE EVALUATION OF ADVANCED ENERGY STORAGE SYSTEMS: A REVIEW. Energy & Environment 34, 1094–1141. https://doi.org/10.1177/0958305X221074729

Yang, P., Sun, P., Mai, W., 2016. Electrochromic energy storage devices. Materials Today 19, 394–402. https://doi.org/10.1016/j.mattod.2015.11.007

CAPÍTULO 3

ESTUDO DA TOLERÂNCIA DE METAIS PESADOS NAS LINHAGENS FÚNGICAS *Rigidoporus lineatus* E *Aspergillus niger*

Data de aceite: 03/06/2024

Hellen Patrícia da Costa Marques
Unifesspa/Instituto de Ciências Exatas/ Faculdade de Química
Marabá-Pará
http://lattes.cnpq.br/5351765647851779

Camylle de Oliveira Carvalho da Silva
Unifesspa/Instituto de Ciências Exatas/ Faculdade de Química
Marabá-Pará
http://lattes.cnpq.br/6985885036478368

Lanniele Drika Carneiro Sousa
Unifesspa/Instituto de Ciências Exatas/ Faculdade de Química
Marabá-Pará
http://lattes.cnpq.br/2716838434928571

Carolyne Alecrim de Oliveira
Unifesspa/Instituto de Ciências Exatas/ Faculdade de Química
Marabá-Pará
http://lattes.cnpq.br/9827296860531729

Andrey Moacir do Rosário Marinho
UFPA/Instituto de Ciências Exatas e Naturais/ Faculdade de Química/LAbiomi
Belém-Pará
http://lattes.cnpq.br/2511998363000599

Patrícia Santana Barbosa Marinho;
UFPA/Instituto de Ciências Exatas e Naturais/ Faculdade de Química/LAbiomi
Belém-Pará
http://lattes.cnpq.br/4826647905254039

Marilene Nunes Oliveira;
Unifesspa/Instituto de Ciências Exatas/ Faculdade de Química
Marabá-Pará
http://lattes.cnpq.br/0204590454010990

Simone Yasue Simote Silva
Unifesspa/Instituto de Ciências Exatas/ Faculdade de Química
Marabá-Pará
http://lattes.cnpq.br/4637413931051021

Ulisses Brigatto Albino
Unifesspa/Instituto de Ciências Exatas/ Faculdade de Química
Marabá-Pará
http://lattes.cnpq.br/1485924743638488

João Batista Pereira Junior
UFBA/Campus Ondina/Instituto de Química
Salvador-Bahia
http://lattes.cnpq.br/8067391313688681

Sebastião da Cruz Silva
Unifesspa/Instituto de Ciências Exatas/ Faculdade de Química
Marabá-Pará
http://lattes.cnpq.br/5097476970597467

RESUMO: O impacto causado pelo descarte de rejeitos no meio ambiente, tem se tornando uma preocupação mundial, pois estes provocam grandes danos ao ambiente. E uma forma de diminuir estes danos é a utilização de microrganismos como biorremediadores, pois estes podem adsorver, reter e até mesmo remover metais pesados desses ambientes. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de absorção de metais pesados pelos fungos *Rigidoporus lineatus* e *Aspergillus niger*, isolados da área de mineração. Os microrganismos foram inoculados em placas de petri contendo meio sólido BDA (batata-dextrose e ágar) enriquecidos com concentrações de 100 mg/L, 500 mg/L e 1000 mg/L dos metais pesados cobalto, cromo, chumbo, cobre e níquel, em seguida as placas de petri foram colocadas na BOD e acompanhadas por um período de 10 dias. Para realizar a análise microscópica por Absorção Atômica com Chama, os microrganismos foram cultivados em erlenmeyers contendo meio liquido BD (batata e dextrose) enriquecidos com metais pesados cobre e chumbo, nas concentrações de 100 mg/L, 500 mg/L e 1000 mg/L, os quais foram deixados por 10 dias na câmara de agitação com temperatura de 30ºC e rotação de 250 rpm. Foi observado que as espécies *A. niger* e *R. lineatus* foram tolerantes a altas concentrações de cobre e chumbo, apresentando um bom desenvolvimento nas placas de petri e nas análises realizadas por Absorção Atômica, os fungos também mostraram ter um bom potencial adsorvente frente aos metais chumbo e cobre.
PALAVRAS-CHAVE: microrganismos, metais pesados, mineração

STUDY OF HEAVY METAL TOLERANCE IN FUNGAL STRAINS *Rigidoporus lineatus* AND *Aspergillus niger*

ABSTRACT: The impact caused by the discharge of waste on the environment has become a worldwide concern, as these disposals cause significant damage to the environment. One way to diminish these impacts is the use of microorganisms as bioremediators, because they are able to adsorb, to retain, and even to remove heavy metals from these environments. Therefore, this study aims to evaluate the capacity of adsorption of heavy metals by the fungi *Rigidoporus lineatus* and *Aspergillus niger*, isolated from a mining area. The microorganisms were inoculated in Petri dishes containing solid medium PDA (potato-dextrose-agar) enriched with concentrations of 100 mg/L, 500 mg/L and 1000 mg/L of the heavy metals cobalt, chromium, lead, copper, and nickel. Then, the Petri dishes were placed in the BOD and monitored for a period of ten days. To execute the Flame Atomic Absorption Microscopy Analysis, the microorganisms were cultivated in Erlenmeyer flasks containing liquid medium PD (potato and dextrose) enriched with the heavy metals copper and lead, at the concentrations of 100 mg/L, 500 mg/L and 1000 mg/L, which were left for ten days on the shaking chamber, at the temperature of 30ºC and rotation of 250 rpm. It was observed that the species *A. niger* and *R. lineatus* were tolerant to high concentrations of copper and lead, having a good development on Petri dishes. The fungi were shown to have a good absorption potential related to the metals copper and lead on the analysis made by Atomic Absorption as well.
KEYWORDS: microorganisms, heavy metals, mining

INTRODUÇÃO

Uma das principais causas da poluição do meio ambiente é o desenvolvimento desproporcional que gera diversos resíduos sem fins adequados, sendo nocivos ao meio ambiente (CARVALHO E PONDOLA, 2022). Assim, consequentemente elevou os agentes de poluição ao meio ambiente, crescendo a presença de pragas tornando necessário a utilização de produtos químicos, como os agrotóxicos (ALVES E OLIVEIRA SILVA, 2003). E, juntamente, resultou em problemas sociais, como: escolas superlotadas, invasões territoriais, violências e principalmente a contaminação de solos e rios, que se encontram nas proximidades destas áreas de mineração, tornando necessários buscar medidas para descontaminar estas áreas impactadas (PALHETA et al, 2017).

Umas dessas atividades nocivas é a mineração, um dos principais setores básicos responsáveis pela economia brasileira. As áreas de mineração, depois de explorados não são renováveis e sua fonte é finita, possuindo assim danos futuros inevitáveis a partir do fechamento de minas ou falência de empresas trazendo consequências aos dependentes da região, que se encontra em maioria (ARAÚJO E FERNANDES, 2016).

Os países da América Latina são exemplos de exploração mineral, por serem ricos em recursos minerais, havendo consequências da elevada extração que afeta diretamente questões ambientais e econômica. Na Colômbia, hoje, há um pensamento mais crítico sobre os impactos ambientais, o que levou o país a procurar alternativas para sanar estes impactos (LÓPEZ-SÁNCHEZ et al, 2017).

A mineração é uma das atividades econômicas mais importantes do Brasil, principalmente na região paraense que tem como saldo comercial 77,5 do Estado. Apesar da importância econômica, a região sofre com muitos problemas ambientais, afetando diretamente o ambiente, tais como: plantas, animais e pessoas, principalmente as que moram no entorno da área (SILVA E ALVES, 2018).

No processo de recuperação de áreas degradadas, como as de mineração, é importante o retorno da atividade microbiana do solo, para facilitar o estabelecimento da vegetação. O solo possui uma biodiversidade específica de cada região, possuindo uma variedade de fungos, tornando-se assim um ambiente promissor para estudos químico de espécies que vivem nesse habitat, muitas dessas espécies de fungos ainda são desconhecidas e merecem atenção para serem estudadas, como remediadores destas áreas impactadas (SUCCAR et. Al, 2019).

Um dos processos para a descontaminação dessas áreas com baixo custo é a biorremediação, que utiliza organismos vivos, como plantas e microrganismos, para transformar os contaminantes em substâncias inertes [8]. Entretanto, é uma técnica muito sensível e que demanda grandes estudos sobre os microrganismos a serem utilizados para o tratamento, pois o processo depende das condições do local a ser tratado, a concentração dos contaminantes, pH, salinidade e umidade do solo (RAMOS et al, 2022).

No processo de biorremediação por microrganismos, os fungos desempenham um papel importante devido à sua capacidade metabólica de degradar diferentes compostos tóxicos e recalcitrantes, como poluentes orgânicos, corantes têxteis, efluentes têxteis, petróleo, hidrocarbonetos poliaromáticos, plásticos e pesticidas (MENEZES et al, 2017).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o crescimento fúngico microscópio e macroscopicamente dos fungos, isolados da área de mineração da Mina do Sossego, *Rigidoporus lineatus* e *Aspergillus niger* em meios sólido e líquido enriquecidos com os metais pesados cobalto, cromo, cobre, chumbo e níquel.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção dos fungos

Os microrganismos estudados foram selecionados da coleção de fungos da micoteca do Laboratório Multidisciplinar de Biologia da Faculdade de Química-UNIFESSPA, as linhagens utilizadas para este trabalho foram o *Aspergillus niger* e *Rigidoporus lineatus.* (Figura 1), isoladas da Lagoa de Rejeito de Mineração da Mina do Sossego, localizada em Canaã dos Carajás/PA.

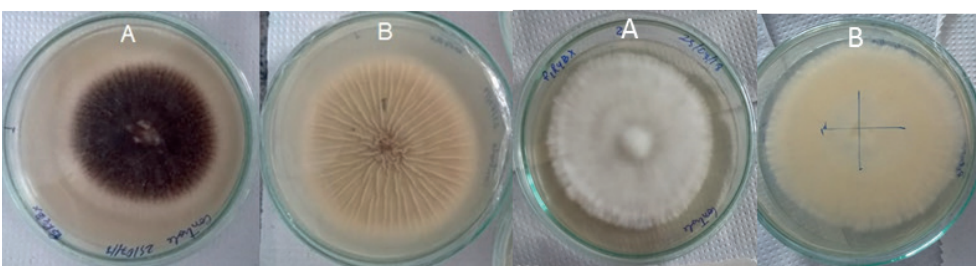


Figura 1: Linhagem fúngica A. niger e R. lineatus frente e verso, respectivamente (A e B)

Preparação do meio de cultura sólido com metais

Para o cultivo das linhagens fúngicas em meio de cultura BDA (batata, dextrose e ágar) enriquecido com sal metálico, utilizou-se frascos de erlenmeyers de 500 mL. Após determinar a massa de sal necessária para preparar as concentrações desejadas realizou-se o preparo da solução com uma quantidade específica de cada metal previamente calculado para um volume de 200 mL. Para a preparação da solução metálica, foram utilizados, separadamente, os sais $CuSO_4$, $CoCl_2.H_2O$, $Pb(NO_3)_2$, $K_2Cr_2O_7$ e $Ni(NO_3)_2$, nas concentrações de 100, 500 e 1000 mg/L.

As soluções preparadas foram transferidas para erlenmeyers de 500 mL, sendo posteriormente vedados por bonecas (algodão e gazes) e em seguida foram cobertos com papel Kraft, evitando-se o contato com o meio externo, e posteriormente foram esterilizados em autoclave Prismatec, modelo CS, série n.14190, voltagem 220V, potência 4.0 kv à 121 ^{0}C, pressão de 1 atm, durante 15 minutos.

Após esterilização, o meio foi vertido em placas de petri, para observar se houve contaminação no meio, o mesmo foi incubado na BOD vertical Cientec@, modelo CT-705-330, série n.1011358, voltagem 220V, potência 600W, por um período de 24h. Em seguida, inoculou-se discos de micélio das linhagens fúngicas em estudo, sendo acompanhado o seu desenvolvimento micelial por um período de 240h (10 dias).

Análise da inibição do crescimento micelial (PIC)

A avaliação do desenvolvimento micelial das linhagens fúngicas, foi analisada de acordo com a concentração de cada metal através do crescimento radial obtido a partir das medidas do diâmetro médio do micélio do fungo a cada 48 horas. A inibição do crescimento micelial (PIC) foi calculada pela equação abaixo.

$$\%PIC = \frac{CRTE - CRT}{CRTE} \times 100$$

Equação 1 - Equação de inibição do crescimento micelial

Onde,

PIC: Inibição do crescimento micelial;

CRTE: Crescimento radial da placa controle (cm);

CRT: Crescimento radial da placa em tratamento (cm).

Preparação do meio de cultura líquido contendo os metais chumbo e cobre

Para o cultivo das linhagens em meio liquido preparou-se 1000 mL do meio de cultura líquido BD (batata e dextrose) e em seguida foi esterilizado em autoclave Prismatec, modelo CS, série n.14190, voltagem 220V, potência 4.0kv, à 121 ^{0}C, pressão de 1 atm, durante 15 minutos. Após realizar o cálculo da quantidade de sal necessário, para cada concentração desejada (100, 500 e 1000 mg/L) os mesmos foram dissolvidos em determinado volume de meio BD, em seguida transferiu-se 20 mL de cada solução de metal para tubos tipo Falcon esterilizados e após 24h inoculou-se fragmentos de micélios dos fungos. Posteriormente, os tubos falcon foram levados para a incubadora com agitação SOLAB, modelo SL-223, modelo SL-223, série n.15-015, potência 1500 w, voltagem 220V, durante 10 dias, a temperatura de 30 °C e rotação de 150 rpm, o experimento foi realizado em triplicata.

Preparo das amostras para análise por espectrometria de absorção atômica com chama

Antes de realizar as análises no equipamento de Espectrometria de absorção atômica com chama - FAAS, foi necessário seguir algumas condições instrumentais especificas para cada metal, as quais são apresentadas na Tabela 1. O limite de detecção (L.O.D) foi calculado seguindo a relação 3 x s/b (s = estimativa do desvio padrão do branco analítico e b = coeficiente angular da curva analítica). Em seguida, foram preparadas soluções padrões dos metais chumbo e cobre, afim de montar a curva analítica para os metais no FAAS, com uma solução padrão de 100 mg/L para cada metal.

Parâmetros	Metais	
	Cobre	Chumbo
Resolução espectral (nm)	0,2	0,2
Corrente de lâmpada (mA)	4,0	4,0
Comprimento de onda (nm)	324,8	217,0
L.O.D (mg/L)	0,02	1,21

Tabela 1 - Condições instrumentais para determinação de cobre e chumbo por FAAS

Preparação da solução de cobre, para análise por FAAS

A partir da solução estoque de cobre (100 mg/L), foram preparadas cinco soluções com as concentrações de 1,0 a 5,0 mg/L, as quais foram utilizadas para montar a curva analítica do metal cobre. As soluções preparadas, foram aferidas com HNO_3 5%, sendo as concentrações de 1,0 mg/L a 4,0 mg/L aferidas até 50 mL e a concentração de 5,0 mg/L aferida até 100 mL.

As amostras contendo o fungo mais o metal cobre, com concentrações de 100, 500 e 1000 mg/L, foram diluídas para em seguida serem analisadas no FAAS Thermo Scientific, série n. 164056, potência 100-240 V. Da concentração de 100 mg/L, foi retirado uma alíquota de 1 mL e aferido até 10 mL com água destilada. Para as concentrações de 500 e 1000 mg/L foram pipetados de cada, separadamente, 100 µL e aferido até 10 mL com água destilada.

Preparação da solução de chumbo, para análise por FAAS

A partir da solução estoque de chumbo (100 mg/L), foram preparadas soluções com as concentrações de 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0 mg/L, as quais foram utilizadas para montar a curva analítica do metal chumbo. As soluções preparadas, foram aferidas com HNO_3 5%, sendo as concentrações de 2,0 a 8,0 mg/L aferidas até 50 mL e a concentração de 10,0 mg/L aferida até 100 mL.

As amostras contendo o fungo mais o metal chumbo, com concentrações de 100, 500 e 1000 mg/L, foram diluídas para em seguida serem analisadas no FAAS. Da concentração de 100 mg/L foi retirado uma alíquota de 1 mL e aferido até 10 mL com água destilada. Para as concentrações de 500 e 1000 mg/L foram pipetados de cada, separadamente, 100 µL e aferido até 10 mL com água destilada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito da concentração dos metais no desenvolvimento dos fungos

A linhagem fúngica *R. lineatus* se desenvolveu bem nas concentrações de 100 mg/L, em quase todos os metais, exceto no metal cromo, pois nesta concentração o metal foi tóxico para a espécie, sendo observado apenas um pequeno desenvolvimento micelial na placa de petri. Nas demais concentrações, de 500 mg/L e 1000 mg/L, observa-se que a espécie fúngica é tolerante somente ao metal chumbo (Figura 2). Já a espécie *A. niger*, se desenvolveu bem em todos os metais, na concentração de 100 mg/L, nas demais concentrações a espécie foi tolerante somente a altas concentrações do metal chumbo (Figura 3).

Apesar do cobre ser um constituinte natural presente nos solos, principalmente do solo de onde os fungos *R. Lineatus* e *A. niger* foram isolados, observou-se que as espécies não foram resistentes a elevadas concentrações deste metal.

No entanto, as espécies foram resistentes a elevadas concentrações do metal chumbo, mesmo com seu alto potencial de toxicidade, os dois fungos tiveram um bom desenvolvimento micelial. Essa relação do metal chumbo com os fungos do solo está relacionado significativamente com o ambiente em um todo, como o pH, as propriedades do solo, o teor de óxido de carbono que são as mais importantes características para um bom desenvolvimento microbiológico no local (YOGABAANU, et al, 2017).

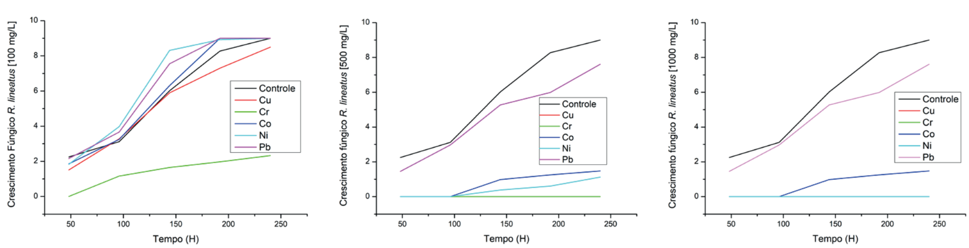


Figura 2: Crescimento fúngico do fungo R. lineatus, na presença dos metais Cobalto, Chumbo, Cobre, Cromo e Níquel em concentrações de 100 mg/L, 500 mg/L e 1000 mg/L

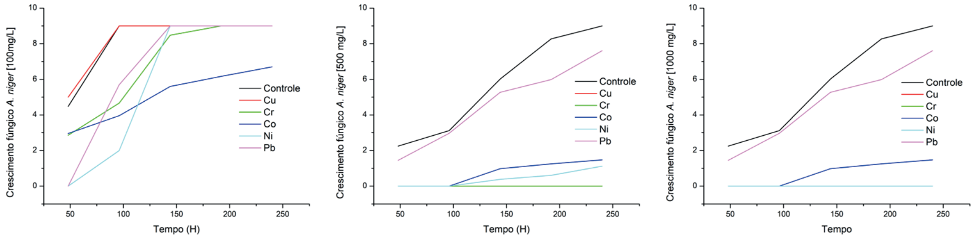


Figura 3: Crescimento fúngico do fungo A. niger, na presença dos metais Cobalto, Chumbo, Cobre, Cromo e Níquel em concentrações de 100 mg/L, 500 mg/L e 1000 mg/L

De acordo com os resultados exibidos na Tabela 2, observa-se que apenas na concentração de 100 mg/L de Cu2+ e Cr6+ houve inibição de crescimento da linhagem fúngica. Em 500 mg/L houve desenvolvimento apenas no íon metálico Pb2+, mostrando que o fungo é tolerante ao chumbo mais que os outros metais estudados, no entanto, no mesmo metal, em 1000 mg/L houve aumento da inibição do desenvolvimento micelial.

Os fungos foram isolados de uma área de mineração, de onde é extraído os minérios ferro e cobre, pela mineradora VALE, e a análise química do rejeito desta área, revelou a presença de diversos metais em diferentes concentrações, além do ferro e cobre. Portanto, pode-se inferir que estes fungos apresentaram resultados de tolerância de acordo com o ambiente que foram isolados.

Concentração (mg/L)	**PIC (%)**				
	Cu^{2+}	Co^{2+}	Pb^{2+}	Cr^{6+}	Ni^{2+}
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
100	28,00	0,00	0,00	74,02	0,00
500	100	100	0,00	100	87,5
1000	100	100	15,41	100	100

Tabela 2. Efeito da dosagem de metais na percentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) do fungo R. lineatus em 240 horas de experimento.

Análise por absorção atômica

Nas amostras contendo cobre, foram detectados que houve diminuição das concentrações iniciais de todas as concentrações utilizadas (100 mg/L, 500 mg/L e 1000 mg/L).

Analisando os dados do fungo *Rigidoporus lineatus*, na solução de 100 mg/L de cobre, verificou-se que o fungo adsorveu 4,7 mg/L, ou seja, 4,7 % da concentração inicial. Em 500 mg/L, o fungo adsorveu, 34,5 mg/L, ou seja, 6,9 % da amostra inicial. Já em 1000 mg/L, houve a adsorção de 110,0 mg/L, logo, 11,0% da quantidade inicial de Cu^{2+} na amostra. (Tabela 3).

Cu^{2+}	$[Cu^{2+}]$ na solução (mg/L) ± desvio padrão	$[Cu^{2+}]$ adsorvida pelo fungo (mg/L)	Remoção (%)
100	95,3±0,70	4,7	4,7
500	465,5±0,23	34,5	6,9
1000	890,0±0,25	110,0	11,0

Tabela 3 - Análise de adsorção do meio líquido enriquecido com metal Cu^{2+} da linhagem R. lineatus

Estando em constante movimento por 240h, observou-se que a percentagem de adsorção se elevou conforme o aumento da concentração. O fungo se desenvolveu nas concentrações de cobre em meio líquido diferentemente do meio sólido, algumas pesquisas mostraram que microrganismos expostos a perturbação constante aumentam a sua tolerância e degradação de substâncias tóxicas do que as células em suspensão (XIA, et al, 2017).

A linhagem fúngica *Aspergillus niger* na concentração de 100 mg/L de cobre, o fungo adsorveu 6,6 mg/L, ou seja, 6,6 % da concentração inicial. Em 500 mg/L, o fungo adsorveu, 464,0 mg/L, ou seja, 92,8 % da concentração. Em 1000 mg/L, houve a adsorção de 143,0 mg/L, cerca de 14,3% (Tabela 4).

Cu^{2+}	$[Cu^{2+}]$ detectada na solução (mg/L) ± Desvio padrão	Concentração de Cu^{2+} adsorvida pelo fungo (mg/L)	Remoção (%)
100	93,37 ± 1,05	6,63	6,6
500	35,82 ± 0,09	464	92,8
1000	857,26 ± 0,90	143	14,3

Tabela 4: Análises de íons Cu^{2+} presentes na solução de diferentes concentrações de amostras da linhagem Aspergillus niger

A partir dos resultados obtidos, o fungo *Aspergillus niger* apresentou valores de adsorção que está acima de 50% na concentração de 500 mg/L, porém na concentração de 1000 mg/L o valor foi inferior a 20%. Cada organismo possui uma capacidade para determinadas substâncias, logo a tolerância do fungo em estudo pode ser alterada conforme a concentração de metal. Assim, o fungo *A. niger* pode tolerar o metal cobre até determinada concentração (ZAFAR, et al, 2017).

Nas amostras com o fungo *R. lineatus* enriquecidas com o metal chumbo, observou-se que o fungo teve um potencial de adsorção maior, quando comparado ao metal cobre, conforme observado na tabela 5, o fungo adsorveu 4,3 mg/L, ou seja, 4,3% da concentração inicial, da solução de 100 mg/L de chumbo. Em 500 mg/L, o fungo adsorveu, 306,5 mg/L, ou seja, 61,3 % da amostra inicial. Já na concentração de 1000 mg/L, houve a adsorção de 817,0 mg/L, logo, 81,7% da quantidade inicial de chumbo na amostra.

Pb^{2+}	$[Pb^{2+}]$ na solução (mg/L) ± desvio padrão	$[Pb^{2+}]$ adsorvida pelo fungo (mg/L)	Remoção (%)
100	95,7±1,93	4,3	4,3
500	193,5±0,15	306,5	61,3
1000	183,0±0,76	817,0	81,7

Tabela 5 - Adsorção do meio líquido enriquecido com metal Pb^{2+} com o fungo *R. lineatus*

Comparando os resultados das amostras contendo cobre, com as amostras contendo chumbo, nestas amostras se teve melhor potencial de adsorção, com o aumento da concentração do metal chumbo, observando a diminuição da presença de íons metálicos na solução. Logo, pode se observar que o fungo *R. lineatus* é um bom adsorvente de íons Cu^{2+} e Pb^{2+}, adsorvendo mais que a metade da concentração presente.

Esse comportamento pode ser explicado a partir do estudo com fungos filamentosos onde observou que em suas propriedades, grande biomassa de cepas são capazes de absorver metais pesados, não apenas um, mas vários metais simultaneamente. Sendo assim, podendo ser utilizados em tratamentos de fluidos. E o uso efetivo desses fungos exigiria que eles tivessem alta tolerância aos metais e que eles fossem capazes de remover metais pesados com eficiência (OLIVEIRA, et al, 2022).

Na análise das amostras do fungo *Aspergillus niger* que continha chumbo foi detectado que houve diminuição das concentrações iniciais de todas as concentrações utilizadas. Na solução de 100 mg/L de Pb^{2+}, o fungo adsorveu 97,3% da concentração inicial. Em 500 mg/L, o fungo adsorveu, 496,0 mg/L, ou seja, 99,2% da concentração inicial. Já em 1000 mg/L, houve a adsorção de 997,0 mg/L, cerca de 99,7% (Tabela 6).

Pb^{2+}	$[Pb^{2+}]$ detectada na solução (mg/L) ± Desvio padrão	Concentração de Pb^{2+} adsorvida pelo fungo (mg/L)	Remoção (%)
100	2,67 ± 1,55	97,3	97,3
500	4,02 ± 0,33	496,0	99,2
1000	2,06 ± 0,57	997,0	99,7

Tabela 6: Análises de íons Pb^{2+} presentes na solução de diferentes concentrações de amostras da linhagem *Aspergillus niger*

Do estudo realizado por Junior e Pereira (JUNIOR e PEREIRA, 2008) sobre a tolerância da linhagem *Aspergillus sp*. ao metal chumbo, os autores observaram que os isolados do gênero *Aspergillus sp* apresentam um bom crescimento no tratamento com metal chumbo.

CONCLUSÃO

As espécies *Rigidoporus lineatus* e *Aspergillus niger* são microrganismos com certo potencial para ser aplicado em tratamento de ambientes contaminados com metais pesados, não só solos como também em efluentes, tendo em vista que se mostraram-se bastante tolerantes ao metal Pb^{2+} no meio sólido, mesmo em grandes quantidades deste metal. Quando realizado as análises por absorção atômica com os metais Pb^{2+} e Cu^{2+}, observou-se que os mesmos são um bom adsorvente, resultados estes que corroboram com aqueles obtidos em meio sólido.

Fungos do gênero *Aspergillus* são aplicáveis em tratamento de ambientes contaminados por possuírem grande capacidade de tolerar e remover metais pesados mesmo estando em elevadas concentrações.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES e a empresa VALE pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS

ALVES, S.R., OLIVEIRA-SILVA, J.J., **Avaliação de ambientes contaminados por agrotóxicos. É veneno ou é remédio?: agrotóxicos, saúde e ambiente** [online]. Rio de Janeiro (RJ): FIOCRUZ; 2003.

ARAÚJO, E.R., FERNANDES, F.R.C., **Mineração no Brasil: crescimento econômico e conflitos ambientais. In. Conflitos Ambientais na Insdústria Mineira e Metalúrgica: o passado e o presente**. Rio de Janeiro (RJ): CETEM; 2016.

CARVALHO, F.R., PODOLAN, P.G., **Agrotóxicos: desigualdade, agentes politraumáticos e proteção do trabalhador**. Veredas do Direito, 2022 19 (45): 221-247.

JUNIOR, F.M.R.S., PEREIRA, S.V., **Ecologia e fisiologia de fungos filamentosos isolados de solo contaminados por metais pesados**. Revista Brasileira de Biociencias, 2008 March 5 (S2): 903-905, https://www.seer.ufrgs.br/index.php/rbrasbioci/article/view/115296.

LÓPEZ-SÁNCHEZ, L.M., LÓPEZ-SANCHÉZ, M.L., MEDINA-SALAZAR, G., **La prevención y mitigacíon de los riesgos de los passivos ambientales mineros (PAM) en Colombia: uma propuesta metodológica**. Entremado, 2017 July 13(1): 78-91.

MENEZES, G., CARVALHO, T.A., ALMEIDA, W.S., SUSSUCHI, E.M., VIÉGAS, P.R.A., MARINO, R., **Bioremediation potential of filamentous fungi in methylene blue: Solid and liquid culture media**. Ciência e Agrotecnologia, 2017 October 41 (5): 526–532.

OLIVEIRA, A.F., FLORENTINO, A.C., VALENTE, A.S., BEZERRA, R.M., ZAMORA, R.M., CARVALHO, J.T., MACIEL, A.F., **Study of biofilms with kefir associated with soy germs (*Glycine* max (L.) Merril)**. Ciência e Natura, 2022 September 44: e47.

PALHETA, J.M., SILVA, C.N., OLIVEIRA, A., NASCIMENTO, F.R., **Conflitos pelo uso do território na Amazônia mineral**. Mercator, 2017, september 16:1-18.

RAMOS, M.A.O., RAMOS, V.A.A., **Soil recovery proposal in the city of Brumadinho – MG**. Ensaios USF, 2022 November 6 (1): 1-19.

SILVA, D., ALVES, L., Mineração e pobreza, um retrato dos municípios paraenses que exploram recursos minerais [online]. Pará c2018.

SUCCAR, J.B., PINTO, G.M., PEREIRA, T.F., DIREITO, I.C.N., ASSIS, M.C., VICTÓRIO, C.P., **Atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas de Myrtaceae contra bactéria multirresistentes. In. Análise Crítica das Ciências Biológicas e da Natureza 2**. Ponta Grossa (PR): Atenas, 2019. p. 181-192.

XIA, L., ZHANG, D., QING, H., **Adsorption characteristics of copper (II), Zinc (II) and Mercury (II) by four kinds of immobilized fungi residues**. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2017 January 147: 357-366.

YOGABAANU, U., WEBER, J.F.F., CONVERY, P., RIZMAN-IDID, M., ALIAS, S.A., **Antimicrobial properties and the influence of temperature on secondary metabolite production in cold environment soil fungi**. Polar Science, 2017 December 14: 60–67.

ZAFAR, Z.L., ASHRAF, M., **Selective leaching kinetics of calcareous phosphate rock in lactic acid**. Chemical Engineering Journal, 2017 July 131 (1-3): 41-48.

POTENCIAL DOS RESÍDUOS VEGETAIS DO EXTRATIVISMO AMAZÔNICO PARA SÍNTESE DE CARVÃO ATIVADO DE ALTA CAPACIDADE ADSORTIVA

Data de aceite: 03/06/2024

Elivelton de Santa Cruz Pereira
Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará – UNIFESSPA, Programa de Pós-Graduação em Química - PPGQ
Marabá-PA
https://lattes.cnpq.br/2789518855121312

Francisco Adriano de Oliveira Carvalho
Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará – UNIFESSPA, Programa de Pós-Graduação em Química - PPGQ
Marabá-PA
http://lattes.cnpq.br/7974443191001763

RESUMO: Muitos são os danos ambientais causados pelo descarte indevido de resíduos, como corantes, metais pesados e compostos orgânicos nos cursos d'água. A adsorção com o uso de carvão ativado oriundo de biomassas tem ganhado destaque na remoção desses poluentes. Assim, o presente trabalho buscou avaliar o potencial adsortivo dos carvões ativados obtidos a partir dos resíduos vegetais do bioma amazônico, cacho de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth), caroço de cajá (*Spondias mombin* L.), casca de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) e braço de buriti (*Mauritia vinifera*), visando a remediação de contaminantes em efluentes aquosos. Os ensaios de adsorção mostram que todos os adsorventes foram mais eficientes para a remoção do corante têxtil verde brilhante (VB), quando comparado a remoção do corante têxtil amarelo ácido 17 (AY 17). Ademais, os adsorventes designados, CCP700 (carvão da casca de cupuaçu a 700 °C), CCJ800 (carvão do caroço de cajá a 800 °C) e o CPP700 (carvão do cacho de pupunha a 700 °C) foram os mais eficientes para a remoção do corante têxtil verde brilhante. Os ensaios de adsorção sugerem, também, que os materiais possuem alta capacidade adsortiva devido à alta remoção do corante têxtil verde brilhante mesmo na presença de uma pequena massa de adsorvente. Além disso, em meio básico o índice de remoção foi superior ao meio ácido, alcançando 99,8% de remoção com 0,2 g de adsorvente e pH 6 para todos os carvões usados no experimento, apontando que as interações eletrostáticas são importantes no processo de adsorção. Outrossim, os ensaios de adsorção com os carvões sintetizados e comercial são muito próximos para a remoção do corante têxtil verde brilhante. Infere-se, portanto, que a utilização dos adsorventes produzidos neste trabalho também é viável para utilização comercial e são promissores para o tratamento de efluentes contaminados.

PALAVRAS-CHAVE: adsorvente; ensaios de adsorção; amarelo ácido 17; verde brilhante.

POTENTIAL OF PLANT RESIDUES FROM AMAZON EXTRACTIVISM FOR SYNTHESIS OF HIGH ADSORTTIVE CAPACITY ACTIVATED CARBON

ABSTRACT: Several environmental damages are caused by the disposal of the waste, such as dyes, heavy metals and organic compounds in waterways. Adsorption process using an activated trigger from biomass has gained prominence in the removal of these pollutants. Thus, the current work focuses to evaluate the adsorptive potential of activated carbons obtained from plant residues from the Amazon biome, peach palm bunch (Bactris gasipaes Kunth), cajá seed (Spondias mombin L.), cupuaçu peel (Theobroma grandiflorum) and buriti arm (Mauritia vinifera), with the remediation of contaminants in aqueous effluents. The adsorption tests show that all adsorbents were more efficient for removing the textile dye brilliant green (VB), when compared to removing the textile dye acid yellow 17 (AY 17). Furthermore, the designated adsorbents, CCP700 (charcoal from cupuaçu shell at 700 °C), CCJ800 (charcoal from cajá seeds at 800 °C) and CPP700 (charcoal from peach palm at 700 °C) were the most efficient for removing brilliant green textile dye. The adsorption tests also suggest that the materials have a high adsorption capacity due to the high removal of the bright green textile dye even in the presence of a small mass of adsorbent. Furthermore, in basic medium the removal rate was higher than in acidic media, reaching 99.8% removal with 0.2 g of adsorbent and pH 6 for all adsorbers used in the experiment, indicating that the electrostatic interactions are important in the process. Furthermore, adsorption tests with synthesized and commercial carbons are very similar for removing the brilliant green fabric dye. It is therefore inferred that the use of the adsorbents produced in this work is also viable for commercial use and is promising for the treatment of contaminated effluents.
KEYWORDS: adsorbent; adsorption assays; acid yellow 17; Bright Green.

INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores e consumidores têxteis, ocupando a quinta posição no ranking mundial da indústria têxtil e é o quarto no ramo de vestuário. No entanto, este setor também tem sido responsável por grandes impactos ao meio ambiente, uma vez que os corantes utilizados na linha de produção quando descartados de forma incorreta nos cursos d’água são considerados fontes altamente poluidoras, visto que, esses compostos apresentam propriedades físicas e químicas que são extremamente prejudiciais ao meio ambiente e aos seres humanos (XAVIER, 2020; CAVALCANTI; SANTOS, 2020). Além disso, os efluentes produzidos pela indústria têxtil impedem a passagem de luz no meio aquático e com isso retardam o processo de fotossíntese (LALNUNHLIMI; KRISHNASWAMY, 2016). Outrossim, dados na literatura reportam que, algumas classes de corantes podem causar irritação na pele, nas vias aéreas e quando ingeridas podem gerar substâncias com propriedade carcinogênicas e mutagênicas (BAZZO, 2015).

Dentre os diversos corantes utilizados na indústria têxtil, destaca-se o amarelo ácido 17 (AY 17), este é um corante aniônico reativo, bastante empregado na indústria têxtil, gráfica e cosmética, bem como no processo de produção de sabão e detergente. O AY 17 pode causar dispneia, dermatite e irritação nos olhos, no sistema cardiovascular e no

sistema nervoso do ser humano. Similarmente, esse corante tem efeitos mutagênicos e tumorigênicos em bactérias, leveduras e em células somáticas de mamíferos, podendo afetar o material genético, e ocasionar problemas na reprodução e crescimento desses seres (ASHRSF et al., 2012).

Outro corante muito utilizado na indústria têxtil, o verde brilhante (VB), possui caráter básico e coloração verde, e geralmente é encontrado na forma de sulfato e pertence à família dos trifenilmetano (CALVETE et al., 2010). O VB é muito utilizado como agente dermatológico, medicamento veterinário e medicamento para a alimentação de aves para inibir a propagação de fungos e parasitas intestinais. Mesmo com tantas aplicações, esse corante pode apresentar diversos problemas para o homem e também para o meio ambiente, causando náuseas, vômitos, diarreia, irritação no trato gastrointestinal e respiratório e durante sua degradação produz óxidos de carbono, óxidos de nitrogênio e óxidos de enxofre (KUMAR & BARAKAT, 2013).

Devido a estes efeitos e impactos no meio ambiente, tem-se buscado cada vez mais desenvolver de novas técnicas eficientes e baixo custo no tratamento de água e efluentes (HYNES, 2020). Dentre os métodos que podem ser empregados para a remoção desses efluentes, o uso do carvão ativado vem sendo altamente empregado no processo de adsorção, já que, a maioria dos processos tradicionais (coagulação, flotação, decantação, filtração e desinfecção) não são considerados totalmente eficientes para a remoção de coloração (KIELING, 2016).

Vale salientar que o uso de adsorventes, provenientes de matérias orgânicas utilizadas no processo de adsorção é considerado de baixo custo, apresentam alta porosidade e, além disso, são materiais que possuem alta disponibilidade, o que não ocorre com maioria dos adsorventes utilizados atualmente no mercado. Diante do exposto, o respectivo trabalho tem como objetivos sintetizar adsorventes a partir das biomassas do caroço de cajá, casca de cupuaçu, cacho de pupunha e braço de buriti (pecíolos das folhas), e avaliar a capacidade adsortiva para os corantes têxteis: amarelo ácido 17 e verde brilhante em meio aquoso.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização dos experimentos, foram coletadas as matérias-primas: cacho de pupunha, casca de cupuaçu, caroço de cajá e braço de buriti (pecíolos das folhas) na comunidade quilombola de Bailique-Centro localizada no município de Oeiras do Pará/PA. Para os testes de adsorção foram utilizados soluções sintéticas de Verde Brilhante (VB) e Amarelo Ácido 17 (AY 17) da Sigma aldrich.

Materiais

Inicialmente, as biomassas foram selecionadas e lavadas com água corrente para a remoção de impurezas. Posteriormente, os insumos foram secos por exposiçção aos raios solares, em seguida, levados para melhor secagem na estufa a 90 °C por 24 h. Depois de isentos de impurezas, os mesmos foram triturados em um moinho de facas tipo Willey (SL-31). A identificação dos grupos funcionais presentes nas biomassas foi realizada através da Espectroscopia de Absorção Molecular na Região do Infravermelho. Os espectros de infravermelho das amostras foram obtidos utilizando o equipamento Agilent Technologies (Cary 630 FTIR) com registros de varreduras na região espectral de 400 a 4000 cm^{-1}.

Posteriormente, os materiais foram submetidos aos ensaios de carbonização em triplicatas num forno mufla da marca MAGNUS sob taxa de aquecimento de 10 °C/min. A primeira carbonização foi realizada com temperatura máxima de 600 °C por 2 h. Repetiu-se os experimentos sob as mesmas condições variando a temperatura para 700, 800 e 900 °C para todos os materiais, exceto para o material oriundo do braço de buriti que a carbonização foi apenas a 600 °C. Para a identificação dos grupos funcionais presentes nas amostras após o processo de carbonização foi seguido o mesmo procedimento realizado para os materiais *in natura*.

Preparação e caracterização dos adsorventes

Em uma balança analítica foram pesadas separadamente a massa do corante Amarelo Ácido 17, o qual possui massa molecular 551,29 $gmol^{-1}$, fórmula molecular $C_{18}H_{10}Cl_2N_4Na_2O_7S_2$ e a massa do corante Verde Brilhante, que possui massa molecular igual a 482,64 $gmol^{-1}$ e fórmula molecular $C_{27}H_{34}N_2O_4S$. Um litro de solução estoque de 1000 mgL^{-1} de cada corante foi preparada e devidamente armazenados até a realização dos ensaios de adsorção.

Curva analítica

A partir das soluções estoque, foram preparadas soluções de Verde Brilhante diluindo alíquotas em tubo *eppendorf* de 2 mL na faixa de concentração de 1,0 a 7,5 mg/L. As leituras no UV-VIS foram realizadas em um espectrofotômetro da marca Bel Espectro S05, com faixa de operação de 320 a 1.000 nm, no comprimento de onda máximo, ($\lambda_{máx}$), 625 nm, para o corante Verde Brilhante e em 400 nm para o corante Amarelo Ácido 17. No entanto, para Amarelo ácido a curva analítica foi construída na faixa de concentração de 1 a 22 mg/L. As amostras foram medidas numa cubeta de quartzo de 1 mL e caminho óptico de 1 cm em triplicata

Descrição do procedimento experimental

Todos os adsorventes foram classificados em peneiras com mesh passante de 325 e retida em peneira com mesh de 400. Inicialmente, foram adicionados 0,5 g dos adsorventes em 100 mL de solução de AY 17 contidas em frasco tipo erlenmeyer de 250 mL na concentração de 100 e 200 mg/L. Em seguida, o erlenmeyer contendo a mistura adsorvente/corante foi levado a uma mesa de agitação orbital da marca Fisatom (mod. 786 e série 2090002), sob agitação de 150 rpm e 25 °C por 200 min.

Para o corante VB os ensaios foram realizados nas mesmas condições do AY 17, porém nas concentrações de 100, 200, 300 e 500 mg/L. Ainda para o VB foram realizado estudos de dosagem (0,1 -1,0 g) e de pH com adição de pequenas quantidades de HCl ou NaOH ajustando os mesmos para (3 – 10), ambos experimentos para concentração de 300 mg/L. Ao final dos experimentos, o adsorvente foi separado do sobrenadante com auxílio de uma centrífuga analógica modelo 80-2B. Por fim, as leituras de absorbâncias para o VB foram realizadas no comprimento de onda de 625 nm e para o AY 17 em 400 nm. Ressalta-se que, os estudos de dosagem e pH foram feitos apenas para os três melhores carvões e na melhor temperatura de carbonização. Todos os experimentos foram realizados triplicatas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Carbonização das biomassas

No processo de carbonização dos materiais a 600 °C, observou-se que não houve carbonização de forma homogênea em todos os precursores. Observa-se através do aspecto visual que ainda há material *in natura* no precursor de caroço de cajá (Figura 1a), isso evidencia que a transferência de calor não ocorreu de forma uniforme para esse material. Os demais materiais apresentaram aspecto homogêneo, não apresentado resíduo não carbonizado, Figura 1b, indicando que a carbonização ocorreu de forma eficiente. A eficiência da carbonização foi confirmada através da Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (FTIR).

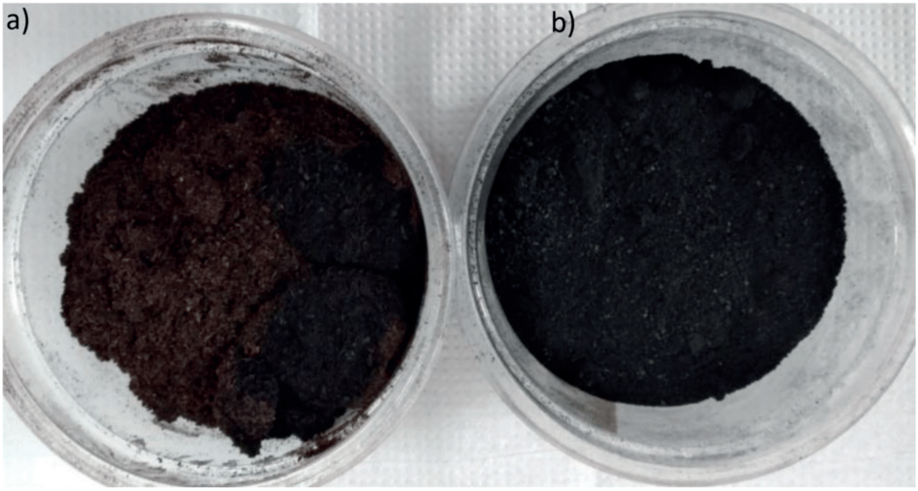


Figura 1: Aspecto visual dos precursores carbonizados: a) Caroço de cajá a 600 °C e b) Pupunha na mesma temperatura.

Os rendimentos obtidos a partir da queima das biomassas são mostrados na Tabela 1.

MATERIAL	600 °C	700 °C	800 °C	900 °C
Caroço de Cajá	Não carbonizou	23%	21,9%	20,3%
Casca de Cupu	27,6%	25,7%	24,1%	22,6%
Cacho de Pupunha	28%	25,2%	22,6%	19,4%
Buriti	11,6%	Não utilizado	Não utilizado	Não utilizado

Tabela 1 - Efeitos da variação de temperatura no rendimento da queima das biomassas por 2 h para massa inicial de 50 g.

É possível observar nos dados da Tabela 1 que com o aumento da temperatura de queima o rendimento diminui para todos os materiais precursores. Vários trabalhos relatam que com o aumento de temperatura o rendimento gravimétrico tende a diminuir devido a maior perda de massa associada ao processo de queima da biomassa (AZEVEDO et al., 2013.; VIEIRA et al., 2013.; SILVA et al., 2018).

O carvão oriundo da biomassa do braço de buriti (pecíolos das folhas) apresentou rendimento muito baixo (11,6%) para a temperatura de carbonização a 600 °C. Devido esse baixo aproveitamento, não foram realizados experimentos de carbonização em temperaturas mais elevadas (LOPES, 2020). Essa baixa porcentagem de produção se deve ao fato desta biomassa apresentar a menor densidade dentre todos os materiais. Outrossim, para essa biomassa, foi perceptível através do aspecto visual grande quantidade de cinzas. De acordo com Silva (2020), a matéria mineral contida nas cinzas é um fator negativo no processo de adsorção, pois causa um efeito desfavorável na remoção de efluentes contaminados.

Caracterização dos adsorventes

Os espectros de infravermelho apresentados na Figura 2 para todos os materiais *in natura* apresentam uma banda bastante larga na região por volta de 3500 a 3200 cm^{-1}, essa é uma banda de estiramento característica do grupo OH (hidroxila), geralmente essa absorção é um indicativo de água nas amostras. Verifica-se também nos espectros *in natura,* que nas regiões próximas de 2800 cm^{-1} aparecem bandas de estiramento que é característico das ligações C-H (sp^2 e sp^3), essas bandas são comumente apresentadas por substâncias lignocelulósicas. Constata-se ainda nos espectros *in natura*, uma banda de estiramento da ligação C-O em 1000 cm^{-1}. Segundo Pavia et al. (2015) as bandas de estiramento C-O aparecem entre 1260 e 1000 cm^{-1}.

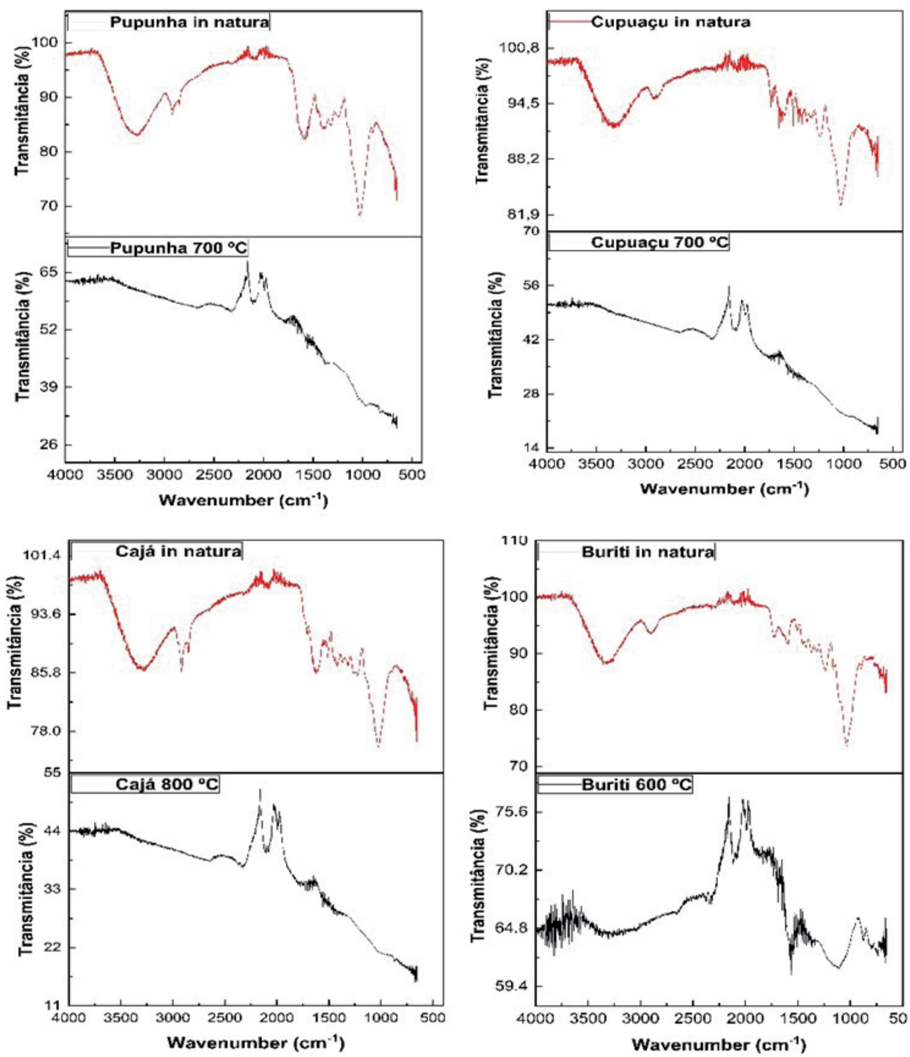


Figura 2: Espectros vibracionais (FTIR) na região de 4000 a 400 cm^{-1}dos adsorventes: *in natura* e carbonizados.

Nos espectros para os precursores carbonizados, percebe-se a ausência das bandas de estiramento dos grupos que apareceram nos materiais *in natura*, indicando que os grupos O-H, C-O, C-H (sp^2 e sp^3) foram eliminados das amostras devido a carbonização nas temperaturas bastante elevadas. Por esse motivo, para as amostras carbonizados quase não é observado bandas vibracionais.

Curva de calibração para o corante aniônico amarelo ácido 17

A curva analítica para o corante têxtil aniônico amarelo ácido 17, na faixa de concentração de 1,0 a 22 mg/L do corante é mostrada na Figura 3.

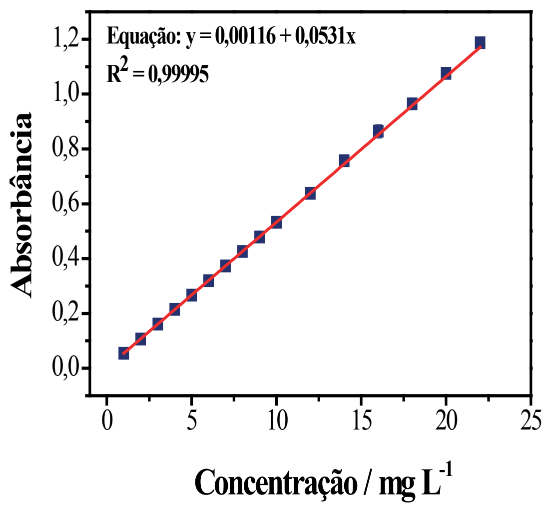


Figura 3: Curva de calibração para o corante têxtil aniônico amarelo ácido 17.

De acordo com Lopes (2020) nesta faixa de concentração a curva de calibração apresentou uma excelente linearidade, caracterizada por um coeficiente de correlação, r^2 de 0,99995. Para concentrações acima de 22 mg/L foi observado um desvio da linearidade devido à alta absortividade molar do corante em 400 nm, favorecendo desvios da lei de Beer-Lambert. Assim, para as amostras com concentrações fora desta faixa de concentração foram realizadas diluições para a quantificação.

Medidas de adsorção para o corante aniônico amarelo ácido 17

A remoção do AY 17 na concentração de 200 mg/L não ocorreu de forma eficiente para todos os materiais adsorventes utilizados. Os testes mostraram que o CCP600 (carvão da casca de cupuaçu a 600 °C) foi o adsorvente que apresentou o maior índice de remoção com porcentagem igual a 35,58% (dados não mostrados). Para verificar se a concentração do corante estava influenciando no processo foram feitos novos ensaios com 100 mg/L do AY 17 (Figura 4). Quando comparado com a concentração de 200 mg/L, há um aumento da capacidade adsortiva para os materiais, em conformidade com dados reportados na literatura, porém abaixo dos índices de remoção ideal para materiais adsorventes, que é acima de 90 %.

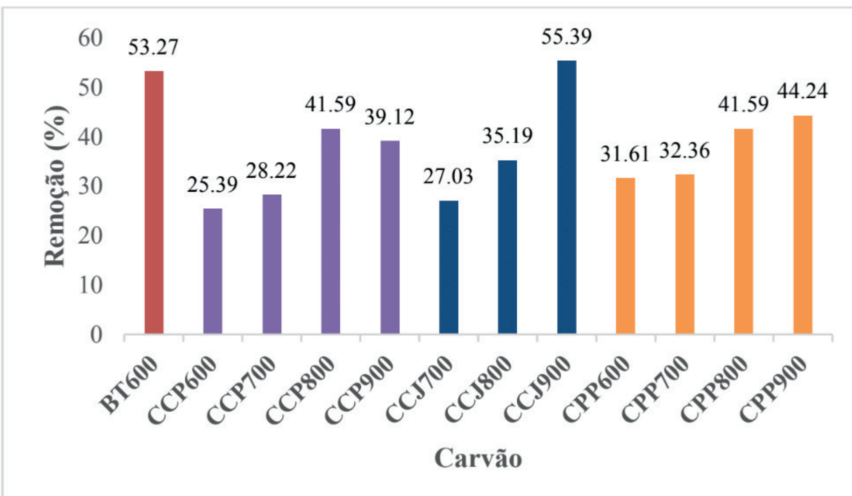


Figura 4: Remoção do corante AY 17 na concentração de 100 mg/L com 0,5 g dos carvões em diferentes temperaturas de carbonização.

De acordo com os dados da Figura 5, observa-se que a melhor remoção, 55,39%, foi o material CCJ900 (carvão do caroço de cajá a 900 °C). Porém, a temperatura do processo de carbonização é um fator predominante para a produção de carvão, pois quanto maior a temperatura maior será o gasto energético, isso acaba tornando a produção mais cara, inviabilizando a produção desse adsorvente, principalmente em escala industrial.

Curva de calibração para o corante têxtil catiônico Verde Brilhante

A curva analítica para o corante têxtil catiônico verde brilhante (VB), na faixa de concentração de 1,0 a 7,5 mg/L do corante é mostrada na Figura 5.

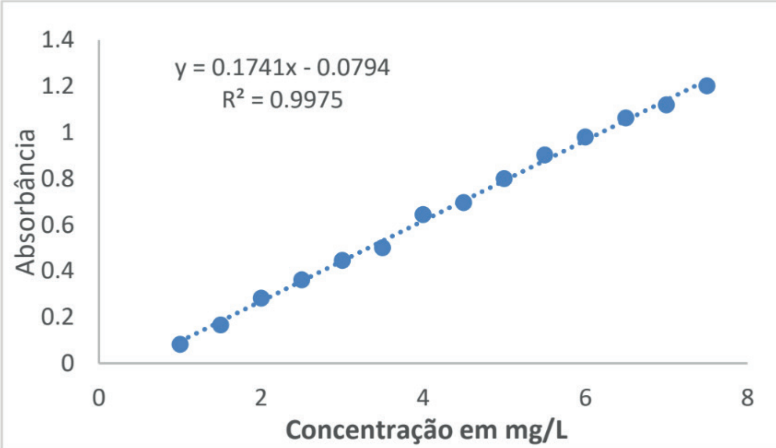


Figura 5: Curva de calibração para o corante têxtil Catiônico verde Brilhante.

A Figura 5 mostra que na faixa de concentração de 1,0 a 7,5 mg/L a curva de calibração apresentou boa linearidade, caracterizada por um coeficiente de correlação, r^2 de 0,9975. Para concentrações acima de 7,5 mg/L foi observado um desvio da linearidade devido à alta absortividade molar do corante catiônico verde brilhante em 625 nm ser favorável ao desvio da lei de Beer-Lambert.

Medidas de adsorção para o corante têxtil catiônico Verde Brilhante

Os ensaios de adsorção para esse corante ocorreram de forma muito eficiente, a Figura 6 mostra que os sobrenadantes do VB apresentam pouca ou mesmo nenhuma coloração para as concentrações de 100, 200 e 300 mg/L. Já para a concentração de 500 mg/L é possível verificar a diferença de cor nos tubos de ensaio, dessa maneira, é perceptível observar diferença através do aspecto visual, indicando que alguns carvões apresentam melhor capacidade adsortiva que outros para remoção desse corante catiônico. Ressalta-se que, a coloração mais forte apresentada nos primeiros tubos de ensaio da esquerda para a direita nas Figuras (6b, 6c e 6d), é da solução inicial, sem uso de carvão.

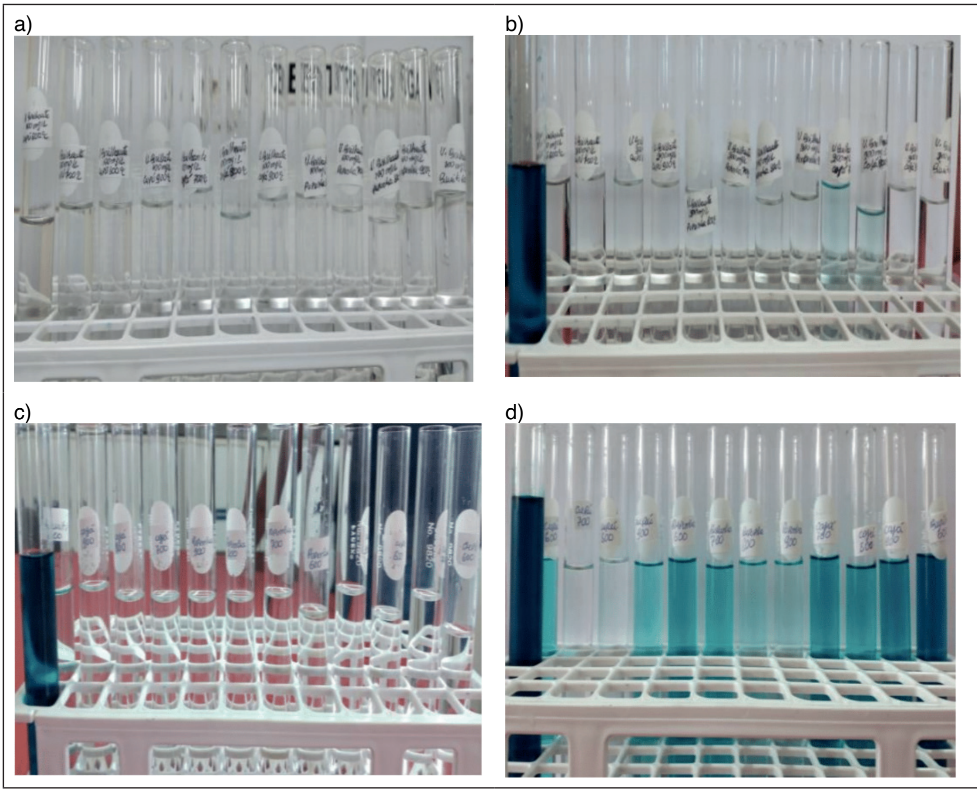


Figura 6: Aspecto visual dos sobrenadantes do VB nas concentrações: a) 100 mg/L, b) 200 mg/L, c) 300 mg/L e d) 500 mg/L após o processo de adsorção,

Os dados reportados na Tabela 2, 500 mg/L de VB, confirmam a alta eficiência adsortiva dos carvões, caracterizado por índices de remoção superiores a 90%. Estes dados permitem afirmar que a interação adsorvente/adsorvato é mais efetiva, quando comparada ao amarelo ácido 17, e pode estar associada ao caráter catiônico do corante VB e ao menor tamanho deste corante. Vale ressaltar que, os ensaios foram feitos nas mesmas condições para os dois corantes.

Materiais	Remoção %
BT600	92,62
CCP600	99,40
CCP700	99,90
CCP800	99,91
CCP900	99,66
CCJ700	98,16
CCJ800	98,94
CCJ900	97,57
CPP600	98,59
CPP700	99,27
CPP800	99,82
CPP900	99,86

Tabela 2 - Remoção do corante VB na concentração de 500 mg/L com 0,5 g dos carvões em diferentes temperaturas de carbonização.

Uma vez que na presença 0,5 g de carvão houve grande remoção do corante VB na concentração de 500 mg/L, foi selecionado, com exceção do CCP600 (carvão do braço de buriti a 600 °C), apenas um carvão de cada precursor para avaliar outros parâmetros no processo de adsorção. Os adsorventes utilizados para os outros processos de adsorção devido ao alto índice de remoção do corante VB também na faixa de concentração de 500 mg/L foram o CCP700 (carvão da casca de cupuaçu a 700 °C) com 99,90% de remoção, o CCJ800 (carvão do caroço de cajá a 800 °C) que obteve 98,94% de remoção e o CPP700 (carvão do cacho de pupunha a 700 °C) com remoção de 99,27%.

Estudo da capacidade de remoção do VB em função da variação de massa dos adsorventes do CCP700, CCJ800 e CPP700

A Tabela 3 mostra o efeito da massa de adsorvente dos diferentes carvões na faixa de 0,1 a 1,0 g na remoção do VB em 300 mg/L a 150 rpm e 25 °C. É observado que para todos os adsorventes, a partir de 0,1 g o percentual de remoção é acima de 95%. Esse alto grau de remoção do corante com uma pequena massa de adsorvente mostra a alta afinidade dos materiais para o verde brilhante.

Nota-se também que, conforme foi aumentada a quantidade dos carvões no experimento, houve maior remoção do corante. Isso acontece porque o número de sítios ativos nos adsorventes é proporcional ao aumento da sua massa, ou seja, há mais locais disponíveis para alocar as moléculas do corante catiônico verde brilhante (FIGUEIREDO, 2022). Por isso, com a utilização de apenas 0,3 g de carvão todos os adsorventes alcançaram remoção acima de 99,7%.

Massa (g)	Remoção %		
	CCP700	CCJ800	CPP700
0,1	97,09	95,45	98,77
0,2	98,65	98,52	99,80
0,3	99,77	99,72	99,85
0,4	99,85	99,84	99,85
0,5	99,85	99,85	99,85
0,6	99,85	99,85	99,85
0,7	99,85	99,85	99,85
0,8	99,85	99,85	99,85
0,9	99,85	99,85	99,85
1,0	99,85	99,85	99,85

Tabela 3 - Estudo da capacidade adsortiva dos carvões (CCP700), (CCJ800) e (CPP700) em função da variação de massa de adsorvente a 150 rpm, 25 ºC, 200 min e 300 mg L^{-1} de VB.

Os resultados para todos os materiais são satisfatórios em escala de laboratório, indicando a viabilidade do uso de biomassas para produção de carvão ativado. O mesmo fato é observado em outros trabalhos, ao aumentar a massa de adsorventes a remoção de corantes é aumentada. Brasil (2019) usa carvão ativado comercial para a remoção do corante amarelo C-RG na concentração de 50 ppm, os resultados mostram que para a concentração do carvão igual a 1 g/L a remoção do corante é de 78,95% e quando a concentração mássica do carvão foi duplicada, alcançou-se 92,02% de remoção do corante.

Outro trabalho que mostra maior remoção com o aumento de massa de adsorvente é o de Valcarenghi et al. (2014), que usa carvão ativado granular (CAG), pó de serragem de MDF e de madeirite como adsorventes para a remoção do corante Azul de Metileno na concentração de 0,15 g/L, o trabalho evidencia que independente do adsorvente os melhores resultados foram alcançados com o aumento da massa, no qual, com a utilização de 6 g de adsorventes os índices de remoção foram de 98,2% para o para serragem de MDF, 97,9% para a serragem de madeirite e aproximadamente 100% para o carvão ativado granular.

Estudo comparativo da adsorção do CCP700, CCJ800 e CPP700 em função do pH

Os resultados para os testes de pH são apresentados na Tabela 4. Para todos os materiais utilizados no experimento verifica-se que houve maior remoção à medida que o pH da solução aumenta. O CCJ800 foi o carvão que apresentou a menor porcentagem de remoção com 78,16% no pH igual a 3. Nesse mesmo pH, o CCP700 apresentou 83,46% de remoção e o carvão com melhor capacidade adsortiva, acima de 99,33%, em toda faixa de pH foi o CPP700.

pH	Remoção %		
	CCP700	CCJ800	CPP700
3	83,46	78,16	99,33
4	99,76	98,95	99,51
5	99,84	93,44	98,90
6	99,84	99,85	99,80
7	99,82	99,85	99,84
8	99,80	99,85	99,85
9	99,80	99,85	99,82
10	99,82	99,85	99,81

Tabela 4 - Comparação da capacidade adsortiva em função do pH dos adsorventes (CCP700), (CCJ800) e (CPP700) a 150 rpm, 25 ºC, 200 min e usando 0,2 g de adsorvente.

A partir do pH 6 todos os carvões alcançaram índice de remoção acima de 99,8%. Conforme verificado por Leal et al. (2012) a maior remoção em valores de pH mais elevados para esse corante se deve ao fato de que o VB é um corante de caráter catiônico, que em pH ácido pode ocorrer uma competição entre os íons H^+ presentes na solução com os íons também de carga positiva presentes no corante verde brilhante, por consequência, em pH ácido o índice de remoção é menor do que em pH alcalino.

A influência do pH no processo de adsorção também é mostrada no trabalho de Ferreira (2013), no qual, foi usado carvão ativado granular comercial e casca de arroz modificada com NaOH para a remoção do corante Amarelo Tartrazina (AT), observou-se que para os dois adsorventes houve mais remoção em pH 2, a maior porcentagem de remoção foi de 20%. Esse fato é explicado porque o grupo N-N do corante AT é negativamente carregado, caracterizando ser um corante aniônico, por isso ele é melhor removido da solução em meio ácido.

O mesmo fato também é observado no trabalho de Marin et al. (2015) que utiliza o adsorvente comercial Dowex™ Optipore™ SD-2 para a remoção do corante Azul Reativo 5G, os resultados mostram que em pH 2 a remoção do corante foi de (292 ± 8 mg/g) e em pH entre 5 e 9 a remoção foi de (aproximadamente 134 ± 9 mg/g). A maior remoção é verificada em pH ácido porque o corante possui um grupo sulfonato, responsável por seu caráter aniônico, possuindo assim, carga parcial negativa. Desse modo, ocorre uma maior interação eletrostática entre a superfície positiva do adsorvente e o corante aniônico, por isso é favorecida a adsorção em pH 2.

Estudo comparativo da adsorção do VB com uso dos carvões produzidos neste trabalho e com um carvão ativado comercial

Para verificar a qualidade dos carvões produzidos, foi realizado ensaios de adsorção do corante verde brilhante na concentração de 500 mg/L usando carvão ativado comercial, os testes foram feitos em duplicatas, nas mesmas condições que foram realizados os ensaios para os carvões sintetizados neste trabalho. O resultado de remoção desse corante com o uso de carvão ativado comercial foi muito satisfatório, com remoção de 99,6%.

Em comparação aos melhores carvões das biomassas utilizadas neste trabalho, nota-se que o potencial adsortivo se mostraram muito eficiente, pois na concentração de 500 mg/L os carvões BT600 (carvão de braço de buriti a 600 °C), CCP700 (carvão da casca de cupu a 700 °C), CCJ800 (carvão do caroço de cajá a 800 °C) e o CPP700 (carvão do cacho de pupunha a 700 °C) apresentaram 92,62%, 99,90%, 98,94% e 99,27% de remoção do corante VB, respectivamente.

CONCLUSÃO

Os ensaios realizados neste estudo indicam o potencial do uso de carvões obtidos de precursores amazônicos como adsorventes alternativos para a adsorção dos corantes têxteis amarelo ácido 17 e verde brilhante em meio aquoso, sendo mais eficientes para o corante catiônico. No que se refere a caracterização dos adsorventes, por meio da espectroscopia vibracional na região do infravermelho, verificou-se que todos os adsorventes apresentam uniformidades estruturais, nos quais os grupos funcionais orgânicos foram removidos durante a carbonização.

Os ensaios de adsorção para o corante amarelo ácido 17 apresentaram valores de remoção máxima de 55,39%. Por outro lado, a remoção do corante verde brilhante alcançaram valores de remoção próximos de 100%, indicando que houve uma maior interação química dos carvões com esse corante, quando comparado com o AY 17. Os estudos também mostraram que o pH influencia diretamente no processo de adsorção do VB, pois em meio básico observa-se maior remoção do que em meio ácido.

Os carvões CCP 700, CPP 700 e CCJ 800 apresentaram valores de remoção iguais ou superiores ao carvão comercial para o corante têxtil verde brilhante. Em razão disso, pode-se inferir que os carvões produzidos a partir dessas biomassas são excelentes alternativas no que diz respeito a substituição do carvão ativado comercial, outrossim, essas fontes renováveis se utilizadas corretamente são opções valiosas para mitigar os impactos causados por esses insumos que na maioria das vezes são descartados incorretamente no meio ambiente.

REFERÊNCIAS

ASHRAF, A. M.; *et al*. **Removal of acid yellow-17 dye from aqueous solution using eco-friendly biosorbent.** Department of Chemistry, University of Malaya, Kuala Lumpur 50603. Desalination and Water Treatment. v. 52. p. 4530-4545. Malaysia, 2012.

AZEVEDO, S. H. C.; *et al*. **Influência da temperatura final de carbonização e da taxa de aquecimento no rendimento gravimétrico e no teor de cinzas do carvão do *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*.** Goiânia: Centro Científico conhecer. v. 9. n. 16. p. 1279. Jul. 2013.

BAZZO, A. **Aplicação e caracterização do caroço de abacate (Persea americana mil) como adsorvente na remoção do corante violeta cristal**. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais). Porto Alegre, RS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2015.

BRASIL, A. J. **Avaliação da capacidade de adsorção do carvão da pirólise do capim elefante em corante têxteis red-SB e amarelo C-RG**. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia Química). Natal-RN: Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2019.

CALVETE, T.; LIMA, E. C.; CARDOSO, N. F.; DIAS, S. L. P.; RIBEIRO, E. S. **Removal of brilliant Green dye from aqueous solutions using home-made activated carbons**. Clean: Soil, Air, Water, v. 38, p. 521-532, 2010.

CAVALCANTI, M. A.; SANTOS, F. G. **A indústria têxtil no Brasil:** uma análise da importância da competitividade frente ao contexto mundial. Pernambuco: Exacta. 20 (3), 706-726, 2020.

FERREIRA, T. F. **Adsorção do corante Amarelo Tartrazina utilizando carvão ativado e casca de arroz**. Trabalho de Diplomação (Curso em Engenharia Química). Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 2013.

FIGUEIREDO, S. P. **Remoção de prednisona por adsorção em carvão ativado obtido a partir do bagaço de oliveira**. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia Química). Bajé: Universidade Federal do Pampa, 2022.

HYNES, N.R.J.; *et al*. **Modern Enabling Techniques and Adsorbents based Dye Removal with Sustainability Concerns in Textile Industrial Sector-A comprehensive review**. Journal of Cleaner Production, 2020.

KIELING, G. A. **Adsorção de betex-benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno – em cinza de casca de arroz e carvão ativado**. Tese de doutorado submetida ao programa de Pós-graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Metais da UFRGS como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora. Porto Alegre: UFRGS, 2016.

KUMAR R.; BARAKAT M.A. **Decolourization of hazardous brilliant green from aqueous solution using binary oxidized cactus fruit peel**. Chemical Engineering Journal, 226, p. 377–383, 2013..

LALNUNHLIMI, S.; KRISHNASWAMY, V. **Decolorization of azo dyes (Direct Blue 151 and Direct Red 31) by moderately alkaliphilic bacterial consortium**. Brazilian Journal of Microbiology, v. 47, p. 39-46, 2016.

LEAL, P. V. B.; *et al*. **Estudo da adsorção do corante azul de metileno em resíduos de babaçu**. Gurupi, TO, Journal of Biotechnology and Biodiversity, 3 (4), 166-171, 2012.

LOPES, O. D. **Estudos de Adsorção do corante amarelo ácido 17 usando carvão ativado do cacho do açaí e da casca da castanha.** Dissertação de mestrado. Marabá: UNIFESSPA, 2020.

MARIM, P.; *et al*. **Avaliação do efeito da temperatura, pH e granulometria do adsorvente na adsorção do corante azul reativo 5G**. Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Engenharia Química da Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Paraná: ENGEVISTA, v. 17. n. 01. p. 59-68, 2015.

DUARTE-NETO, F. J.; *et al*. **Processos de adsorção de corantes em argilas esmectíticas: uma revisão.** Campina Grande: Revista Eletrônica de Materiais e Processos. v. 9. n. 1. p. 51-59, 2014.

PAVIA, K. D.; *et al*. **Introdução a espectroscopia**. 2. ed. São Paulo: Cengage Leaning, 2015.

SILVA, C. R.; *et al*. **Influência da temperatura final de carbonização nas características do carvão vegetal de espécies tropicais.** Gurupi, TO, Brazilian Journal of Forestry Researc. PFB, 2018.

SILVA, O. E. D. **Produção de carvão ativado a partir de endocarpo de coco para aplicação em processos de adsorção da dipirona.** Trabalho Final de Curso (Engenharia Química). João Pessoa, PB, Universidade Federal da Paraíba, 2020.

VALCARENGHI, G.; *et al*. **Adsorção de azul de metileno de solução aquosa com utilização de pó de serragem de mdf e madeirite e carvão ativado granular**. Florianópolis, SC, XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2014.

VIEIRA, S. R.; *et al*. **Influência da temperatura no rendimento dos produtos da carbonização de *Eucalyptus microcorys*.** Cerne: Lavras. v. 19. n. 1. p. 59-64, 2013.

XAVIER, F. S. C. **Avaliação da remoção de corantes têxteis presentes em águas residuárias utilizando bagaço de cana-de-açúcar como adsorvente**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental). Centro de Ciências e Tecnologia. Campina Grande: Universidade Estadual da Paraíba, 2020.

CAPÍTULO 5

COMPLEXOS LIPÍDICO-PROTEICOS NO TRATAMENTO ALTERNATIVO DO CÂNCER: HAMLET, BAMLET E ALPHA-1H

Data de aceite: 03/06/2024

Lucas Emanuel Oliveira Sabino
Universidade Federal do Norte do Tocantins
Centro de Ciências Integradas
Araguaína – TO
orcid.org/0000-0003-1726-8962

Karen Leticia Gomes da Silva
Universidade Federal do Norte do Tocantins
Centro de Ciências Integradas
Araguaína – TO
orcid.org/0000-0003-0962-4453

Edenilson dos Santos Niculau
Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará (Unifesspa)
Marabá - Pará
orcid.org/0000-0003-0326-5795

RESUMO: Este estudo aborda o desafio global representado pelo câncer, destacando o câncer de pulmão como uma das principais causas de mortalidade, especialmente em indivíduos com menos de 70 anos. Apesar dos avanços nas terapias convencionais, como cirurgia, quimioterapia e radioterapia, os resultados muitas vezes são limitados, e os efeitos colaterais adversos persistem. Nos últimos anos, proteínas derivadas do leite, como HAMLET, BAMLET e Alpha 1H, têm ganhado destaque como uma abordagem terapêutica inovadora. Essas proteínas, inicialmente identificadas no leite materno, apresentam propriedades únicas para o tratamento do câncer. O estudo explora suas características estruturais, mecanismos de ação e resultados de estudos pré-clínicos. O câncer colorretal (CCR) é particularmente abordado nos ensaios clínicos, onde o HAMLET demonstra citotoxicidade irreversível em células CRC. No entanto, linhagens mutantes, como BRAF, podem apresentar resistência. O BAMLET, variante bovina, também exibe características tumoricidas, especialmente em células de adenocarcinoma. Além disso, o Alpha 1H, isolado da alfa-lactoalbumina, revela eficácia no tratamento de câncer de bexiga. Essas proteínas destacam-se por sua atividade seletiva contra células tumorais, oferecendo vantagens em relação a terapias convencionais. No entanto, desafios como otimização da formulação, administração clínica e realização de estudos clínicos em larga escala precisam ser superados. Comparadas a outras terapias em desenvolvimento, essas proteínas apresentam complexidade

e amplitude em suas ações, proporcionando uma alternativa promissora no tratamento do câncer. Pesquisas futuras são essenciais para validar sua eficácia e posicionar essas proteínas como opções terapêuticas viáveis no combate ao câncer.
PALAVRAS-CHAVE: Tratamento de câncer. HAMLET/BAMLET. Alpha-1H.

LIPID-PROTEIN COMPLEXES IN THE ALTERNATIVE TREATMENT OF CANCER: HAMLET, BAMLET AND ALPHA-1H

ABSTRACT: This study addresses the global challenge posed by cancer, with a particular focus on lung cancer as a leading cause of mortality, especially in individuals under the age of 70. Despite considerable advancements in conventional therapies such as surgery, chemotherapy, and radiation therapy, the outcomes often remain limited, accompanied by persistent adverse effects. In recent years, proteins derived from milk, namely HAMLET, BAMLET, and Alpha 1H, have garnered attention as an innovative therapeutic approach. Originally identified in breast milk, these proteins exhibit unique properties for cancer treatment. The study explores their structural characteristics, mechanisms of action, and outcomes from preclinical studies. Colorectal cancer (CRC) is specifically addressed in clinical trials, where HAMLET demonstrates irreversible cytotoxicity in CRC cells. However, mutant lineages, such as BRAF, may exhibit resistance. BAMLET, a bovine variant, also displays tumoricidal characteristics, especially in adenocarcinoma cells. Additionally, Alpha 1H, isolated from alpha-lactalbumin, proves effective in treating bladder cancer. These proteins stand out for their selective activity against tumor cells, offering advantages over conventional therapies. Nevertheless, challenges such as optimizing formulation, clinical administration, and conducting large-scale clinical studies need to be overcome. Compared to other therapies in development, these proteins exhibit complexity and broad-spectrum actions, providing a promising alternative in cancer treatment. Future research is essential to validate their efficacy and position these proteins as viable therapeutic options in the fight against cancer.
KEYWORDS: Cancer treatment. HAMLET/BAMLET. Alpha-1H.

INTRODUÇÃO

O câncer continua a ser uma das principais causas de mortalidade em todo o mundo, sendo o principal limitante do crescimento populacional mundial e de acordo com estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer de pulmão é o que mais mata pessoas abaixo de 70 anos (FERLAY *et al.*, 2020), representando um desafio significativo para a saúde pública e a medicina moderna (BRAY *et al.*, 2018).

Apesar dos avanços consideráveis na compreensão da biologia tumoral e das terapias convencionais disponíveis, muitos pacientes enfrentam resultados limitados de tratamento, juntamente com efeitos colaterais adversos. Assim, a busca por terapias inovadoras e mais eficazes é essencial (BASKAR *et al.*, 2012; HANAHAN, D.; WEINBERG, 2000).

Nos últimos anos, uma nova abordagem terapêutica tem despertado interesse crescente: o uso de complexos de proteínas derivadas do leite, como HAMLET (Human

Alpha-lactalbumin Made Lethal to Tumor cells), BAMLET (Bovine Alpha-lactalbumin Made Lethal to Tumor cells) e Alpha 1H (Alpha-lactalbumin holo-form). Essas proteínas, inicialmente identificadas no leite materno, mostraram propriedades únicas e promissoras para o tratamento do câncer (FISCHER *et al.*, 2004; HÅKANSSON *et al.*, 1995; HO *et al.*, 2021; PUTHIA *et al.*, 2014).

O objetivo deste capítulo é fornecer uma visão abrangente sobre os complexos proteicos HAMLET, BAMLET e Alpha 1H, bem como suas aplicações potenciais no tratamento do câncer. Serão abordados seus mecanismos de ação, resultados de estudos pré-clínicos e clínicos, além de uma discussão sobre suas potencialidades e desafios.

Na primeira seção, será realizada uma revisão das terapias convencionais disponíveis para o tratamento do câncer, destacando suas limitações e os efeitos colaterais associados. Em seguida, serão apresentados os complexos HAMLET, BAMLET e Alpha 1H, incluindo suas características estruturais e mecanismos de ação específicos.

Posteriormente, será feita uma análise dos estudos pré-clínicos que investigaram o potencial antitumoral dessas proteínas, discutindo as evidências de atividade seletiva contra células cancerígenas e os possíveis mecanismos pelos quais elas induzem a morte celular.

Em seguida, serão examinados os ensaios clínicos conduzidos até o momento, avaliando a eficácia e a segurança de HAMLET, BAMLET e Alpha 1H em pacientes com câncer. Serão discutidos os resultados obtidos, as populações estudadas e as perspectivas clínicas futuras. Além disso, serão abordadas as potencialidades dessas proteínas como terapias complementares ou alternativas aos tratamentos convencionais, bem como os desafios associados à sua produção em larga escala e administração clínica.

CÂNCER E TERAPIAS CONVENCIONAIS

O câncer é uma doença caracterizada pelo crescimento descontrolado e anormal de células que perderam a capacidade de realizarem apoptose (JR; ROSENBERG; LAWRENCE, 2001). Essas células invadem tecidos saudáveis do organismo causando diversos efeitos fisiológicos maléficos, como por exemplo, o sequestro de recursos para manter o seu crescimento a modificação do ambiente em sua volta, como o aumento do volume (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

As formas de tratamento tradicionais que têm sido amplamente utilizadas no tratamento do câncer são a cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2007; ROY; SAIKIA, 2016).

A cirurgia é frequentemente o primeiro passo no tratamento do câncer, com o objetivo de remover o tumor primário e tecidos adjacentes afetados. No entanto, a cirurgia nem sempre é viável, especialmente em casos de tumores metastáticos ou quando a remoção completa do tumor é difícil devido à localização ou disseminação, e há evidências que a remoção de um tumor via cirurgia pode aumentar ou gerar metástases (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2023; TOHME; SIMMONS; TSUNG, 2017).

A quimioterapia é uma abordagem que utiliza medicamentos anticancerígenos para destruir ou inibir o crescimento das células cancerígenas. Esses medicamentos podem ser administrados por via oral ou intravenosa e viajam pelo corpo para atingir as células cancerígenas em várias partes do organismo. Embora a quimioterapia seja eficaz na destruição de células cancerígenas, ela também pode afetar células saudáveis em rápida divisão, resultando em efeitos colaterais como fadiga, queda de cabelo, náuseas e supressão do sistema imunológico e em alguns casos apresentar alta toxicidade que pode levar à falha do sistema hepático (CHABNER; ROBERTS, 2005; JOHN W. EKLUND; MARY F. MULCAHY, 2005)

A radioterapia utiliza radiação ionizante de alta energia para destruir as células cancerígenas ou impedir seu crescimento. A radioterapia é frequentemente usada após a cirurgia para eliminar células cancerígenas remanescentes, funcionando como uma extensão do tratamento anterior, ou como tratamento primário para tumores inoperáveis. Embora seja altamente eficaz no controle do câncer, a radioterapia possui certa toxicidade ao organismo humano, podendo causar danos às células saudáveis próximas à área tratada, resultando em efeitos colaterais como fadiga, inflamação da pele e distúrbios gastrointestinais (HANAHAN; WEINBERG, 2011; NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2023).

Embora essas terapias convencionais sejam amplamente utilizadas e tenham melhorado os resultados do tratamento em muitos casos, elas têm limitações significativas. Além dos efeitos colaterais mencionados, algumas células cancerígenas podem desenvolver resistência aos medicamentos quimioterápicos ou à radiação, levando à recorrência do câncer. Nesse contexto, a busca por terapias alternativas e complementares se torna crucial. A descoberta e o estudo de novas abordagens terapêuticas, como as proteínas HAMLET, BAMLET e Alpha 1H, oferecem perspectivas promissoras para o tratamento do câncer.

COMPLEXOS HAMLET, BAMLET E ALPHA 1H

Os complexos proteicos HAMLET (Human Alpha-lactalbumin Made Lethal to Tumor cells), BAMLET (Bovine Alpha-lactalbumin Made Lethal to Tumor cells) e a Alpha 1H (Alpha-lactalbumin holo-form) são agregados de proteínas com ácidos graxos que têm despertado interesse na comunidade científica devido à sua atividade seletiva contra células tumorais e ao potencial de minimizar danos às células normais (RATH *et al.*, 2018). Essas proteínas, derivadas da alfa-lactoalbumina, bovina e humana, e do ácido oleico, exibem propriedades únicas que lhes conferem atividade seletiva contra células tumorais, representando uma abordagem promissora para a terapia anticâncer (FISCHER *et al.*, 2004; HÅKANSSON *et al.*, 1995; HO *et al.*, 2021; PUTHIA *et al.*, 2014).

A alfa-lactoalbumina (α-LA) humana é uma proteína globular de 14,2 kDa com 123 resíduos de aminoácidos. Além disso, ela contém uma similaridade relativamente alta com o lisossomo, com 47 resíduos iguais e ainda contendo uma estrutura tridimensional similar (BARBANA; SÁNCHEZ; PÉREZ, 2011; HÅKANSSON *et al.*, 1995). Na glândula

mamária dos mamíferos ela participa na síntese da lactose, controlando a especificidade da galactosiltransferase, que faz parte de um sistema de transferência de grupos galactosil para glicoproteínas (PERMYAKOV; BERLINER, 2000).

A α-LA é formada por basicamente duas regiões: uma região alfa e outra beta. A região alfa constitui-se por quatro alfa-hélices e por duas 3_{10}-hélices e a região beta por e três folhas beta antiparalelas, conectados pelo íon Ca^{2+}, e estabilizados por quatro pontes de dissulfeto (Figura 1) (BARBANA; SÁNCHEZ; PÉREZ, 2011).

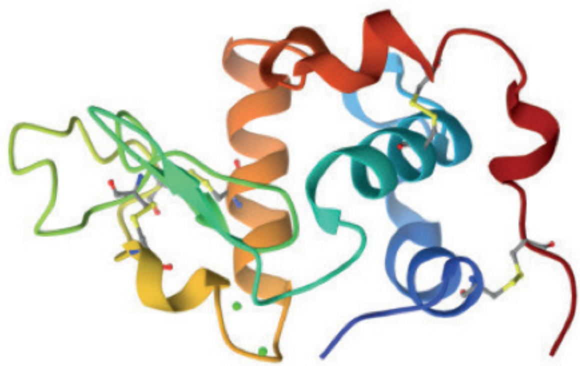


Figura 1 - Estrutura tridimensional da alfa-lactoalbumina.

Fonte: Protein Data Bank (2023). Disponível em: <https://www.rcsb.org/structure/1a4v>.

A α-LA humana é uma proteína que está fortemente ligada ao íon Ca^{2+}, que por sua vez ajuda a estabilizar a estrutura quaternária da proteína. Ele está em coordenação com os carboxilatos e carbonilas dos resíduos da cadeia da proteína. O íon ainda se localiza entre os dois domínios da proteína, fazendo uma conexão entre ambos e a ligação é extremamente forte, com uma constante de associação de 3×10^8 a 20º C (Figura 2). Diferentes estudos apontam para as diferenças em ação biológica dessa proteína com outros cátions, como Mg^{2+}, Na^+ e K^+ (JØHNKE *et al.*, 2012; PERMYAKOV; REYZER; BERLINER, 1993; PERMYAKOV; KREIMER, 1986).

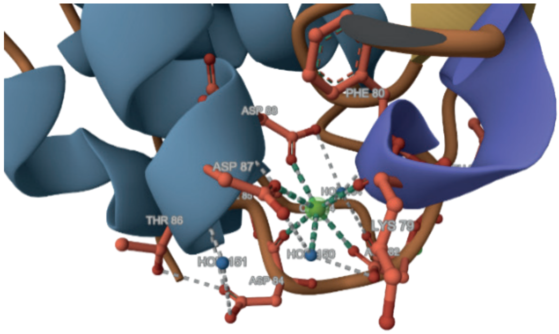


Figura 2 - Ampliação do sítio de ligação de Ca(II). Ca(II) é íon central em verde claro e as moléculas coordenadoras do íon em vermelho.

Fonte: Protein Data Bank (2023). Disponível em: <https://www.rcsb.org/structure/1a4v>.

Uma propriedade bastante útil da ALA é sua capacidade de assumir conformações estáveis intermediárias, isto é, conformações espaciais diferentes do seu estado nativo (SVANBORG *et al.*, 2003; SVENSSON *et al.*, 2000). Esse estado amorfo intermediário é um estado no qual a proteína está levemente desnaturada e perdeu o íon Ca^{2+}. Neste estado, ela oscila entre os estados secundários e terciários.

Essa propriedade torna-se bastante útil na formação dos complexos e na sua atividade antineoplásica. Neste estado, sem o íon, ela torna-se mais hidrofóbica, o que facilita sua adesão com ácidos graxos (HO *et al.*, 2013; JØHNKE *et al.*, 2012; SVANBORG *et al.*, 2003).

Dos ácidos graxos, mostrou-se que ela liga-se com C18:0, C16:0, C14:0 e C18:1 (SVENSSON *et al.*, 2000) e também com compostos de baixa polaridade e também de baixo peso molecular (PERMYAKOV; BERLINER, 2000). Desses ácidos graxos, o ácido oleico (C18:1) foi o que se mostrou mais impactante no efeito citotóxico do complexo, o que sugere que o estado amorfo apresenta determinada especificidade estérica.

HAMLET é o complexo formado pela associação da alfa-lactoalbumina do leite humano com o ácido oleico. Naturalmente, a alfa-lactoalbumina não tem afinidade suficiente para ligar-se à ácidos graxos e por isso a síntese desses complexos depende da abertura da estrutura, tratamento por EDTA ou por cromatografia (BARBANA; SÁNCHEZ; PÉREZ, 2011). Estudos iniciais demonstraram que o HAMLET tem a capacidade de se ligar seletivamente a células tumorais, desencadeando mecanismos de morte celular programada, como apoptose e autofagia (HÅKANSSON *et al.*, 1995).

Evidências mostram que somente a α-LA demonstra certa citotoxicidade à células tumorais e bactérias (HÅKANSSON *et al.*, 1995), porém, quando a proteína é tratada pelas técnicas supracitadas, ela é condicionada a voltar à sua condição fechada e liga-se a um íon Ca^{2+}, e por essa razão, a citotoxicidade desaparece. Os ácidos graxos, neste caso,

funcionam tanto como um transportador da proteína no líquido intracelular da célula tumoral, como um estabilizador da estrutura celular, fazendo com o que o complexo apresente atividade tumorcida (MOSSBERG *et al.*, 2010). Essa conclusão corrobora com os achados de Delgado e colaboradores (2015).

O BAMLET é uma variante bovina do complexo HAMLET, e surgiu quase ao mesmo tempo que os estudos sobre o HAMLET (HÅKANSSON *et al.*, 1995). Essas duas áreas de pesquisa compartilham resultados semelhantes, mostrando atividade seletiva contra células tumorais e indução de apoptose tanto pelo HAMLET quanto pelo BAMLET (XIAO *et al.*, 2013).

O entendimento acerca da funcionalidade destes complexos é ainda incerto. Diversos estudos apontam para uma miríade de possíveis causas, variando desde os íons da membrana, histonas, organelas e enzimas específicas do substrato celular (RATH *et al.*, 2018). O que é majoritariamente aceito é que, como apontado anteriormente, o ácido oleico é o principal fator da toxicidade para as células tumorais, e a α-LA funcionaria como um cavalo de troia, carregando o ácido dentro de sua cavidade e levando para dentro da célula (DELGADO *et al.*, 2015; RATH *et al.*, 2018).

Trabalhos foram feitos para tentar ilustrar esse mecanismo como o de Kaspersen e colaboradores (2014) usando espalhamento de raio-x de baixo ângulo (SAXS) reconstruíram um modelo molecular genérico dos complexos. A estrutura, semelhante a uma lipoproteína recebeu, o nome de “liprotídio” (Figura 3), no qual refere-se a uma estrutura micelar no núcleo estabilizada por uma concha proteica flexível (KASPERSEN *et al.*, 2014).

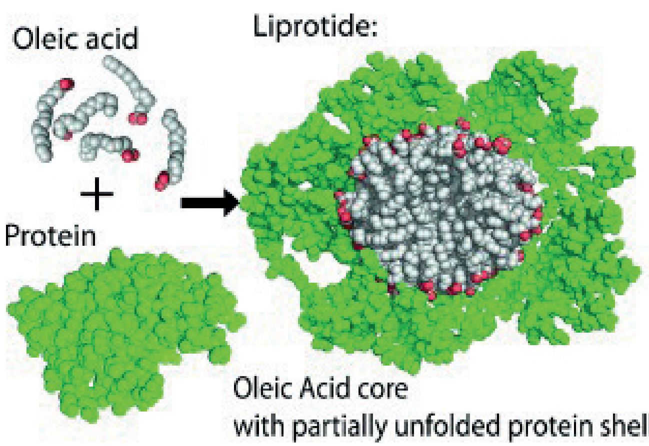


Figura 3 - Ilustração representando os complexos lipídico-proteicos na estrutura chamada “liprotídio”.

Fonte: Kaspersen *et al.* (2014). Copyright: Wiley-VCH GmbH. Reproduzido com autorização.

O Alpha 1H é o domínio alfa-1, N-terminal, desta proteína isolado. Estudos têm demonstrado que a Alpha 1H pode induzir a morte seletiva de células tumorais, enquanto preserva a viabilidade de células normais e ainda apresenta pouca ou nenhuma toxicidade ao organismo (BRISUDA *et al.*, 2021). Além disso, o Alpha 1H pode formar complexos com oleato de sódio.

Pelo fato de ser o primeiro de seus pares a ser sintetizado, o Alpha 1H torna-se o primeiro complexo a ser utilizado em estudos clínicos, isso por conta da sua capacidade de ser produzido em larga escala. Um estudo clínico feito em pacientes recém-operados de câncer de bexiga mostrou descamação de células cancerígenas após o tratamento com o complexo alfa-1-oleato (BRISUDA *et al.*, 2021), um resultado bastante promissor na busca por formas alternativas de combater o câncer.

As proteínas HAMLET, BAMLET e Alpha 1H têm sido objeto de intensa investigação devido ao seu potencial no tratamento do câncer. Essas proteínas, derivadas da alfa-lactoalbumina e do ácido oleico, exibem propriedades únicas que lhes conferem atividade seletiva contra células tumorais, representando uma abordagem promissora para a terapia anticâncer.

As proteínas HAMLET, BAMLET e Alpha 1H têm demonstrado um potencial significativo como terapias inovadoras no tratamento do câncer. A interação com componentes específicos das células cancerígenas, como receptores de superfície e proteínas intracelulares, desencadeia respostas celulares que levam à morte seletiva das células tumorais.

Apesar do grande potencial dessas proteínas, há desafios a serem superados. Um dos principais desafios é a otimização da formulação e administração dessas proteínas para garantir sua estabilidade, biodisponibilidade e eficácia terapêutica. Além disso, é necessário aprofundar os estudos pré-clínicos e realizar ensaios clínicos em larga escala para avaliar a segurança, eficácia e tolerabilidade dessas proteínas em pacientes com diferentes tipos de câncer.

Em comparação com outras terapias em desenvolvimento, as proteínas HAMLET, BAMLET e Alpha 1H apresentam vantagens significativas. Ao contrário de muitas terapias convencionais que têm como alvo vias de sinalização específicas, essas proteínas possuem uma atividade ampla e complexa, abrangendo diferentes vias celulares envolvidas no crescimento e sobrevivência das células tumorais. Além disso, a seletividade dessas proteínas na indução da morte celular em células cancerígenas, enquanto poupam as células normais, oferece uma vantagem terapêutica importante.

Ainda é necessário um trabalho adicional para comparar as proteínas HAMLET, BAMLET e Alpha 1H com outras terapias em desenvolvimento, como imunoterapia, terapia genética e terapias-alvo. A combinação dessas abordagens pode abrir caminho para estratégias terapêuticas ainda mais eficazes e personalizadas para o tratamento do câncer.

ESTUDOS CLÍNICOS

No que diz respeito ao uso do complexo proteico-lipídico HAMLET (*Human Alpha-lactalbumin Made LEthal to Tumor cells*), os estudos clínicos recentes de ŽILINSKAS *et al.*, (2023) evidenciam que a proteína possui um alto potencial no tratamento contra o câncer podendo ser considerado um novo candidato para prevenção e terapia do câncer colorretal (CCR).

O CCR é definido como um tipo de câncer que atinge o revestimento interno do cólon ou do reto em seus estágios iniciais e é caracterizado como uma neoplasia com alto índice letal. Conforme os estudos de PRADO *et al.*, (2022), há uma série de fatores que evidenciam o seu índice de letalidade elevado, dentre eles encontram-se as dificuldades enfrentadas após a detecção tardia da doença, que ocasiona o seu progresso gerando estágios avançados no paciente e consequentemente dificulta os tratamentos quimioterápicos.

Diante disso, ŽILINSKAS *et al., (*2023) ressalta que o uso correto do complexo para uma análise *in vitro* no tratamento do câncer colorretal em seu estágio avançado, necessita de uma atenção minuciosa com a apropriação de estratégias, seletividade e abordagens metodológicas personalizadas. Com o foco na investigação do efeito do complexo na viabilidade, via de morte e bioenergética mitocondrial de células CRC acompanhadas dos diferentes status de mutação KRAS/BRAF *in vitro*, em seus estudos apropriou-se de metodologias que consistiram nas análises do efeito do HAMLET em três linhagens diferentes (Caco-2, LoVo, WiDr).

Sendo assim, por meio dos ensaios de viabilidade celular, clonogênicos, das análises de Western Blot, citometria de fluxo, estatísticas juntamente com a medição da função mitocondrial em células cancerígenas, extração de RNA e reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR). Suas análises foram promissoras obtendo bons resultados durante a aplicação da proteína no tratamento do câncer, constatando que HAMELT apresenta citotoxicidade irreversível em células CRC humanas, possibilitando um alto desempenho na eliminação de células cancerígenas, entretanto algumas linhas de células mutantes como a BRAF apresentaram resistência durante o tratamento, logo compreende-se que deverão ser realizados etapas futuras da pesquisa, para um melhor entendimento dessas observações.

Em outra perspectiva, além dos fatos evidenciados com o uso do HAMLET existem inúmeros fatores que afetam negativamente o tratamento do CCR. Com base nisso, podem ser feitas análises alternativas com foco na utilização de outras espécies de complexos proteicos, em busca de métodos de otimização para o tratamento da doença em seu estágio avançado.

Conforme os estudos de BABAZADEH *et al.*, (2023) a proteína α-lactalbumina bovina (BAMLET) semelhante ao HAMLET, pode ser indicada para avaliação dos mesmos

efeitos submetidos ao método terapêutico nas células do câncer colorretal. Diante disso para avaliação dos efeitos em com a aplicação desta nova proteína, as análises in vitro demostraram que BALMET possui características tumoricidas contra as células cancerígenas como, por exemplo, (A549) e HT-29 e DLD1 presentes no carcinoma pulmonar.

Sendo assim, suas pesquisas consistiram na comparação dos resultados de BAMLET e 5-FU, no direcionamento do tronco em células de adenocarcinoma avaliando a viabilidade celular de células colorretais sendo elas HT-29 e HCT116, por meio de análises estatísticas, avaliação das expressões de genes envolvidos na área de estudo (caule do câncer) e da citometria de fluxo de ambas as células de cancro do cólon humano.

O *stemmes* é uma característica importante do CCR pois, representa à propriedade das células cancerígenas de adquirir características semelhantes às células-tronco (s*tem cells*) e consequentemente a existência dessas características é o fator principal responsável pela resistência do celular dificultando o tratamento do câncer. Em vista disso, foram realizadas análises complementares para avaliar o efeito do complexo sob os essa propriedade celular que traz atrasos no método terapêutico por meio das mesmas linhagens celulares.

Os resultados obtidos por esse estudo demonstraram que BAMLET possui grande relevância no direcionamento dos *stemmes* nas células CRC humanas em relação ao 5-FU, logo BABAZADEH *et al.*, (2023) enfatiza que os resultados destas pesquisas foram de grande importância para evidenciar uma possível otimização no tratamento das CRC no CCR tendo em vista os *stemmes* e a utilização do BAMLET.

Por fim referente ao uso do complexo proteico-lipídico Alpha 1H ou Alpha-Oleato, os estudos de HIEN *et al.*, (2020) demonstram que essa proteína também pode ser implementada em metodologias terapêuticas no tratamento de câncer. Esta pesquisa evidenciou que a alfa-helicoidal N-terminal da alfa-lactalbumina aplicada ao método de escalonamento de dose *in vivo*, aboliu a massa tumoral dos camundongos tratados em seu estudo, corroborando com a eficácia anticâncer sem o aumento de efeitos colaterais.

PERSPECTIVAS FUTURAS E CONCLUSÃO

Em conclusão, as proteínas HAMLET, BAMLET e Alpha 1H representam uma abordagem promissora no tratamento do câncer, com mecanismos de ação distintos, potencialidades significativas e desafios a serem superados. Comparadas a outras terapias em desenvolvimento, essas proteínas oferecem vantagens únicas que as destacam como uma alternativa promissora para o tratamento do câncer.

No entanto, é importante destacar que a aplicação clínica dessas proteínas ainda está em estágios iniciais e são necessárias mais pesquisas para melhor compreender seus mecanismos de ação, otimizar sua eficácia e determinar as melhores estratégias de administração em pacientes com diferentes tipos de câncer.

Em suma, as proteínas HAMLET, BAMLET e Alpha 1H representam uma abordagem promissora para o tratamento do câncer, explorando mecanismos específicos que induzem a morte seletiva de células tumorais e a compreensão aprofundada de seus mecanismos de ação e a realização de estudos clínicos são passos importantes para validar sua eficácia e estabelecer seu papel no arsenal terapêutico contra o câncer.

REFERÊNCIAS

BABAZADEH, M.; ZAMANI, M.; MEHRBOD, P.; MOKARRAM, P. Stemness targeting of colorectal cell lines mediated by BAMLET and 5-Flourouracil. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 664, p. 136–141, 5 jul. 2023. DOI 10.1016/j.bbrc.2023.04.010. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006291X23004114?via%3Dihub. Acesso em: 5 nov. 2023.

BARBANA, C.; SÁNCHEZ, L.; PÉREZ, M. D. Bioactivity of α-lactalbumin related to its interaction with fatty acids: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 8, p. 783–794, set. 2011. https://doi.org/10.1080/10408398.2010.481368.

BASKAR, R.; LEE, K. A.; YEO, R.; YEOH, K.-W. Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. **International Journal of Medical Sciences**, v. 9, n. 3, p. 193–199, 2012. https://doi.org/10.7150/ijms.3635.

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L.; TORRE, L. A.; JEMAL, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018. DOI 10.3322/caac.21492. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.3322/caac.21492. Acesso em: 15 jul. 2023.

BRISUDA, A.; HO, J. C. S.; KANDIYAL, P. S.; NG, J. T.-Y.; AMBITE, I.; BUTLER, D. S. C.; HÁČEK, J.; WAN, M. L. Y.; TRAN, T. H.; NADEEM, A.; TRAN, T. H.; HASTINGS, A.; STORM, P.; FORTUNATI, D. L.; ESMAEILI, P.; NOVOTNA, H.; HORŇÁK, J.; MU, Y. G.; MOK, K. H.; … SVANBORG, C. Bladder cancer therapy using a conformationally fluid tumoricidal peptide complex. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 3427, 8 jun. 2021. DOI 10.1038/s41467-021-23748-y. Disponível em: https://www.nature.com/articles/s41467-021-23748-y. Acesso em: 15 jul. 2023.

CHABNER, B. A.; ROBERTS, T. G. Chemotherapy and the war on cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 1, p. 65–72, jan. 2005. DOI 10.1038/nrc1529. Disponível em: https://www.nature.com/articles/nrc1529. Acesso em: 15 jul. 2023.

DELGADO, Y.; MORALES-CRUZ, M.; FIGUEROA, C. M.; HERNÁNDEZ-ROMÁN, J.; HERNÁNDEZ, G.; GRIEBENOW, K. The cytotoxicity of BAMLET complexes is due to oleic acid and independent of the α-lactalbumin component. **FEBS Open Bio**, v. 5, n. 1, p. 397–404, 2015. DOI 10.1016/j.fob.2015.04.010. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1016/j.fob.2015.04.010. Acesso em: 13 dez. 2022.

FERLAY, Jacques.; ERVIK, M.; LAM, F.; COLOMBET, M.; MERY, L.; PIÑEROS, M.; ZNAOR, A.; SOERJOMATARAM, I.; BRAY, F. International Agency for Research on Cancer (IARC). 2020. Disponível em: http://gco.iarc.fr/today/home. Acesso em: 15 jul. 2023.

FISCHER, W.; GUSTAFSSON, L.; MOSSBERG, A.-K.; GRONLI, J.; MORK, S.; BJERKVIG, R.; SVANBORG, C. Human α-Lactalbumin Made Lethal to Tumor Cells (HAMLET) Kills Human Glioblastoma Cells in Brain Xenografts by an Apoptosis-Like Mechanism and Prolongs Survival. **Cancer Research**, v. 64, n. 6, p. 2105–2112, 16 mar. 2004. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-03-2661. Disponível em: https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-2661. Acesso em: 13 dez. 2022.

HÅKANSSON, A.; ZHIVOTOVSKY, B.; ORRENIUS, S.; SABHARWAL, H.; SVANBORG, C. Apoptosis induced by a human milk protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 17, p. 8064–8068, 15 ago. 1995. https://doi.org/10.1073/pnas.92.17.8064.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 7 jan. 2000. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 4 mar. 2011. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013.

HIEN, T. T.; AMBITE, I.; BUTLER, D.; WAN, M. L. Y.; TRAN, T. H.; HÖGLUND, U.; BABJUK, M.; SVANBORG, C. Bladder cancer therapy without toxicity—A dose-escalation study of alpha1-oleate. **International Journal of Cancer**, v. 147, n. 9, p. 2479–2492, nov. 2020. DOI 10.1002/ijc.33019. Disponível em: https://onlinelibrary-wiley.ez6.periodicos.capes.gov.br/doi/10.1002/ijc.33019. Acesso em: 6 nov. 2023.

HO, J. C. S.; AMBITE, I.; MOK, K. H.; BABJUK, M.; SVANBORG, C. A scientific journey from discovery to validation of efficacy in cancer patients: HAMLET and alpha1-oleate. **Molecular & Cellular Oncology**, v. 8, n. 5, p. 1974278, 3 set. 2021. DOI 10.1080/23723556.2021.1974278. Disponível em: https://doi.org/10.1080/23723556.2021.1974278. Acesso em: 15 jul. 2023.

HO, J. C. S.; STORM, P.; RYDSTRÖM, A.; BOWEN, B.; ALSIN, F.; SULLIVAN, L.; AMBITE, I.; MOK, K. H.; NORTHEN, T.; SVANBORG, C. Lipids as Tumoricidal Components of Human α-Lactalbumin Made Lethal to Tumor Cells (HAMLET): UNIQUE AND SHARED EFFECTS ON SIGNALING AND DEATH*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 24, p. 17460–17471, 14 jun. 2013. DOI 10.1074/jbc.M113.468405. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925820458879. Acesso em: 21 jul. 2023.

JOHN W. EKLUND, M. D.; MARY F. MULCAHY, M. D. Chemotherapy Dosing in the Setting of Liver Dysfunction. ONCOLOGY Vol 19 No 8. v. 19, 1 jul. 2005. Disponível em: https://www.cancernetwork.com/view/chemotherapy-dosing-setting-liver-dysfunction. Acesso em: 16 jul. 2023.

JØHNKE, M.; PETERSEN, T. E.; JØHNKE, M.; PETERSEN, T. E. The Alpha-Lactalbumin/Oleic Acid Complex and Its Cytotoxic Activity. **Milk Protein**. [*S. l.*]: IntechOpen, 2012. DOI 10.5772/48184. Disponível em: https://www.intechopen.com/chapters/38827. Acesso em: 31 jul. 2023.

JR, V. T. D.; ROSENBERG, S. A.; LAWRENCE, T. S. **Devita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles and Practice of Oncology**. 6. ed. [*S. l.*]: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.

KASPERSEN, J. D.; PEDERSEN, J. N.; HANSTED, J. G.; NIELSEN, S. B.; SAKTHIVEL, S.; WILHELM, K.; NEMASHKALOVA, E. L.; PERMYAKOV, S. E.; PERMYAKOV, E. A.; PINTO OLIVEIRA, C. L.; MOROZOVA-ROCHE, L. A.; OTZEN, D. E.; PEDERSEN, J. S. Generic Structures of Cytotoxic Liprotides: Nano-Sized Complexes with Oleic Acid Cores and Shells of Disordered Proteins. **ChemBioChem**, v. 15, n. 18, p. 2693–2702, 15 dez. 2014. DOI 10.1002/cbic.201402407. Disponível em: https://chemistry.europe.onlinelibrary.wiley/doi/10.1002/cbic.201402407. Acesso em: 16 jul. 2023.

MOSSBERG, A.-K.; HUN MOK, K.; MOROZOVA-ROCHE, L. A.; SVANBORG, C. Structure and function of human α-lactalbumin made lethal to tumor cells (HAMLET)-type complexes. **The FEBS Journal**, v. 277, n. 22, p. 4614–4625, 2010. DOI 10.1111/j.1742-4658.2010.07890.x. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1742-4658.2010.07890.x. Acesso em: 15 jul. 2023.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. Non-Small Cell Lung Cancer Treatment - NCI. 6 jul. 2023. [pdqCancerInfoSummary]. Disponível em: https://www.cancer.gov/types/lung/patient/non-small-cell-lung-treatment-pdq. Acesso em: 15 jul. 2023.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. What Is Cancer? - NCI. 17 set. 2007. [cgvArticle]. Disponível em: https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer. Acesso em: 15 jul. 2023.

PERMYAKOV; BERLINER, L. J. α-Lactalbumin: structure and function. **FEBS Letters**, v. 473, n. 3, p. 269–274, 19 maio 2000. DOI 10.1016/S0014-5793(00)01546-5. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014579300015465. Acesso em: 12 dez. 2022.

PERMYAKOV, E. A.; REYZER, I. L.; BERLINER, L. J. Effects of Zn(II) on galactosyltransferase activity. **Journal of Protein Chemistry**, v. 12, n. 5, p. 633–638, 1 out. 1993. DOI 10.1007/BF01025128. Disponível em: https://doi.org/10.1007/BF01025128. Acesso em: 16 jul. 2023.

PERMYAKOV; KREIMER, D. I. Effects of pH, temperature and Ca2+ content on the conformation of alpha-lactalbumin in a medium modelling physiological conditions. **General Physiology and Biophysics**, v. 5, n. 4, p. 377–389, ago. 1986. .

PRADO, T. Á. do; BEL, G. V. D.; LEVIGNALI, M. B.; RESENDE, U. Oxaliplatin versus Irinotecan no câncer colorretal avançado. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 55, n. 3, p. e-189669, 9 nov. 2022. DOI 10.11606/issn.2176-7262.rmrp.2022.189669. Disponível em: https://www.revistas.usp.br/rmrp/article/view/189669. Acesso em: 3 nov. 2023.

PUTHIA, M.; STORM, P.; NADEEM, A.; HSIUNG, S.; SVANBORG, C. Prevention and treatment of colon cancer by peroral administration of HAMLET (human α-lactalbumin made lethal to tumour cells). **Gut**, v. 63, n. 1, seç. Colon, p. 131–142, 1 jan. 2014. DOI 10.1136/gutjnl-2012-303715. Disponível em: https://gut.bmj.com/content/63/1/131. Acesso em: 15 jul. 2023.

RATH, E. M.; CHENG, Y. Y.; PINESE, M.; SARUN, K. H.; HUDSON, A. L.; WEIR, C.; WANG, Y. D.; HÅKANSSON, A. P.; HOWELL, V. M.; LIU, G. J.; REID, G.; KNOTT, R. B.; DUFF, A. P.; CHURCH, W. B. BAMLET kills chemotherapy-resistant mesothelioma cells, holding oleic acid in an activated cytotoxic state. **PLOS ONE**, v. 13, n. 8, p. e0203003, 29 ago. 2018. DOI 10.1371/journal.pone.0203003. Disponível em: https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0203003. Acesso em: 16 abr. 2023.

ROY, P. S.; SAIKIA, B. J. Cancer and cure: A critical analysis. **Indian Journal of Cancer**, v. 53, n. 3, p. 441, set. 2016. DOI 10.4103/0019-509X.200658. Disponível em: https://journals.lww.com/indianjcancer/Fulltext/2016/53030/Cancer_and_cure__A_critical_analysis.27.aspx. Acesso em: 15 jul. 2023.

SVANBORG, C.; AGERSTAM, H.; ARONSON, A.; BJERKVIG, R.; FISCHER, W.; GUSTAFSSON, L.; HALLGREN, O.; LELJONHUVUD, I.; LINSE, S.; MOSSBERG, A.; NILSSON, H.; PETTERSSON, J.; SVENSSON, M. HAMLET Kills Tumor Cells by an Apoptosis-Like Mechanism Cellular, Molecular, and Therapeutic Aspects. 2003. .

SVENSSON, M.; HÅKANSSON, A.; MOSSBERG, A.-K.; LINSE, S.; SVANBORG, C. Conversion of α-lactalbumin to a protein inducing apoptosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 8, p. 4221–4226, 11 abr. 2000. DOI 10.1073/pnas.97.8.4221. Disponível em: https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.97.8.4221. Acesso em: 22 jul. 2023.

TOHME, S.; SIMMONS, R. L.; TSUNG, A. Surgery for Cancer: A Trigger for Metastases. **Cancer Research**, v. 77, n. 7, p. 1548–1552, 2 abr. 2017. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-16-1536. Disponível em: https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1536. Acesso em: 15 jul. 2023.

XIAO, Z.; MAK, A.; KOCH, K.; MOORE, R. B. A molecular complex of bovine milk protein and oleic acid selectively kills cancer cells in vitro and inhibits tumour growth in an orthotopic rat bladder tumour model. **BJU International**, v. 112, n. 2, p. E201–E210, 2013. DOI 10.1111/j.1464-410X.2012.11737.x. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1464-410X.2012.11737.x. Acesso em: 13 dez. 2022.

ŽILINSKAS, J.; STUKAS, D.; JASUKAITIENĖ, A.; ŠAPAUSKIENĖ, J.; BANIENĖ, R.; TRUMBECKAITĖ, S.; ŠVAGŽDYS, S.; CICCIU, M.; DAMBRAUSKAS, Ž.; GULBINAS, A.; TAMELIS, A. HAMLET effect on cell death and mitochondrial respiration in colorectal cancer cell lines with KRAS/BRAF mutations. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 149, n. 11, p. 8619–8630, 1 set. 2023. DOI 10.1007/s00432-023-04777-0. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s00432-023-04777-0. Acesso em: 3 nov. 2023.

CAPÍTULO 6

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MITIGAÇÃO DE METANO ENTÉRICO UTILIZANDO EXTRATO DE *Acmella oleracea* COMO ALTERNATIVA NA MODULAÇÃO DA FERMENTAÇÃO RUMINAL

Data de aceite: 03/06/2024

Leticia Virginia Pereira Leal
Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará
Marabá – Pará
http://lattes.cnpq.br/4530070075701045

Iranilde Teodoro Reis
Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará
Marabá – Pará
http://lattes.cnpq.br/1903251351746627

Licarion Pinto
Universidade Estadual do Rio de Janeiro
Rio de Janeiro – Rio de Janeiro
http://lattes.cnpq.br/5267552018296169

Marilene Nunes Oliveira
Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará
Marabá – Pará
http://lattes.cnpq.br/0204590454010990

Sebastião da Cruz Silva
Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará
Marabá – Pará
http://lattes.cnpq.br/5097476970597467

Rafael Mezzomo
Universidade Federal Rural da Amazônia
Parauapebas – Pará
http://lattes.cnpq.br/0676459050707457

Simone Yasue Simote Silva
Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará
Marabá – Pará
http://lattes.cnpq.br/4637413931051021

RESUMO: O efeito estufa vem se agravando no planeta, em especial pela emissão de dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4) e óxido nitroso (N_2O). No Brasil, uma das principais fontes antrópicas de metano na agropecuária é a criação de bovinos. As plantas medicinais são bastante utilizadas como fonte natural de modulação da fermentação ruminal. Isso ocorre devido a presença de metabólitos secundários em toda a extensão da planta. Modificar a fermentação entérica é difícil sem causar efeitos adversos, logo esse presente estudo tem como objetivo explorar a mitigação do metano entérico utilizando como suplemento alimentar extrato de *Acmella oleracea* usando como parâmetro de mitigação a digestibilidade da matéria seca (DIVMS) e a produção de ácidos graxos voláteis (AGV). O experimento foi realizado por fermentação ruminal *in vitro*. Foi adicionada ao substrato volumoso:concentrado (50:50) o extrato

etanólico de *Acmella oleraceae* (AO) na concentração de 0 mg/mL (controle), 3mg/mL (T3), 30mg/mL (T30) e tempo de incubação de 6, 12, 24h. Para avaliar produção de AGV, foi feita a análise multivariada de dados que consiste no tempo de incubação, concentração de AO e interação "*tempo x concentração*". A digestibilidade da Matéria seca presentou alteração significativa ($p < 0.05$) no tempo de 24h em ambos os tratamentos (T3 e T30) em relação ao controle. No que se refere a produção de acetato, propionato e butirato, a única variável significativa foi o tempo de incubação ($p < 0,05$) em relação ao controle. Conclui-se que a utilização do extrato de AO houve um decréscimo na digestibilidade em tempos maiores de incubação, mas não alterou a produção de AGV. Sendo assim, havendo a possibilidade de mitigar a emissão de metano e a busca de novos parâmetros.
PALAVRAS-CHAVE: *Acmella*; Bioinsumo; Metabolitos secundários; Fermentação ruminal.

EVALUATION OF THE METHANE MITIGATION POTENTIAL OF *Acmella oleracea* EXTRACT AS AN ALTERNATIVE IN MODULATING RUMINAL FERMENTATION

ABSTRACT: The greenhouse effect has been worsening on the planet, especially due to the emission of carbon dioxide (CO_2), methane (CH_4) and nitrous oxide (N_2O). In Brazil, one of the main anthropogenic sources of methane in agriculture is cattle farming. Medicinal plants are widely used as a natural source for modulating rumen fermentation. This is due to the presence of secondary metabolites throughout the plant. Modifying enteric fermentation is difficult without causing adverse effects, so this study aims to explore the mitigation of enteric methane using Acmella oleracea extract as a feed supplement, using dry matter digestibility (DIVMS) and volatile fatty acid (VFA) production as mitigation parameters. The experiment was carried out using in vitro ruminal fermentation. The ethanolic extract of Acmella oleraceae (AO) was added to the volume:concentrate substrate (50:50) at a concentration of 0 mg/mL (control), 3mg/mL (T3), 30mg/mL (T30) and incubation times of 6, 12 and 24 hours. To assess VFA production, multivariate data analysis was carried out, consisting of incubation time, OA concentration and "time x concentration" interaction. Dry matter digestibility showed a significant change ($p < 0.05$) at 24 hours in both treatments (T3 and T30) compared to the control. With regard to the production of acetate, propionate and butyrate, the only significant variable was the incubation time ($p < 0.05$) compared to the control. It can be concluded that the use of OA extract led to a decrease in digestibility at longer incubation times, but did not alter VFA production. Therefore, there is the possibility of mitigating methane emissions and searching for new parameters.
KEYWORDS: Acmella; Bioinsumo; Secondary metabolites; Rumen fermentation.

INTRODUÇÃO

Segundo o Banco mundial (2022), a população mundial atual é cerca de 8 bilhões de pessoas. Em relação há duas décadas (6,14 bilhões), houve um aumento de, aproximadamente 23 % em relação a população atual. Com a população crescendo de forma gradual estima-se que em 2050 haverá uma superpopulação (Herrero, et al., 2015). O Brasil ocupa a primeira posição do ranking mundial de criação de bovinos, contendo aproximadamente 234,4 milhões de cabeça de gado ultrapassando a Índia. Atrelada ao

crescimento populacional e o aumento da renda *per capita,* há um aumento na produção da pecuária – atividade de criação de animais que deve atender a demanda de carne e leite da população. Vinculada ao desenvolvimento da pecuária, no período de 1961 a 2018, a liberação de metano aumentou em 51,4%. (IBGE, 2022; EMBRAPA, 2022; Chang et al., 2021).

Os principais gases do efeito estufa são: dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4), oxido nitroso (N_2O) e fluorados (F-gases) (EPA, 2023). Alguns critérios determinam o impacto desses gases no clima, o prazo de vida e a capacidade de reter calor. Sendo assim, o metano que é segundo mais abundante do GEE, responsável por cerca de 17,6% – o primeiro é o CO_2 (74,4%) – das emissões globais. Por apresentar curto período de vida (uma década) e a capacidade de reter calor 25 vezes maior que a do CO_2 torna o principal alvo de diversos estudos que visam buscar estratégias que possam mitiga-lo e consequentemente, reduzir o aquecimento global (IPCC, 2014; Pinto et al., 2022).

Em 2020, o Brasil foi responsável por 3,09% da emissão de gases global – cerca de 1.4 bilhões de toneladas brutas de CO_2 equivalente (CO_{2eq}) – e assim, tornando-se o 7° país que mais emite GEE. Da emissão total de $CO_{2eq,}$ 26 % corresponde a emissão de metano. Dentre a emissão de metano antropogênico, o setor agropecuário é o principal responsável, majoritariamente pela fermentação entérica de animais ruminantes (Climate Watch, 2022; SEEG, 2020).

Além de impactar, negativamente, o meio ambiente, a produção de metano pelos animais ruminantes também reduz a eficiência energética alimentar. Entre 2 - 15% da energia bruta é perdida na formação de gás durante a digestão no metabolismo desses animais (Tawab et al., 2020).

A microbiota dos ruminantes vem sendo alvo de diversos estudos pela complexidade da fermentação ruminal e assim, muitas estratégias vêm sendo desenvolvidas utilizando mecanismos de inibição de CH_4 como: a inibição de protozoários presente no rúmen; a estimulação da produção de propionato; a redução da produção de hidrogênio; Inibição dos micro-organismos metanogênicos (Castro- Montoya et al. 2012).

Alguns parâmetros são empregados para detectar a diminuição na produção de metano proveniente da fermentação ruminal, tais como a elevação da capacidade de digerir a matéria seca (DIVMS) e a proporção de ácidos graxos voláteis (AGV) (Beauchemin et al., 2020).

A partir da degradação dos compostos dietéticos, principalmente, dos carboidratos são gerados alguns produtos de fermentação. Os ácidos graxos voláteis (AGV) são a principal fonte enérgica dos ruminantes. Os mais abundantes são, acetato, butirato e propionato. Ademais, também são produzidos gases como o dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4), gás hidrogênio (H_2) e amônia (NH_3) e são excretados para o meio ambiente por eructação (Alemu et al. 2011)

O gás Hidrogênio (H_2) presente no rúmen influência nas proporções de AGV's

e na formação de metano. Na produção de propionato, o H_2 é removido. Enquanto na produção de acetato e butirato, liberam H_2 para serem formados. Os micro-organismos metanogênicos precisam de H_2 para reduzir o CO_2, dessa maneira produzindo CH_4. Assim, a formação de propionato entra em competição com os micro-organismos metanogênicos presentes no rúmen, pelo H_2 disponível. Portanto, o aumento da produção de propionato é uma alternativa para reduzir a produção de metano entérico (Janssen, 2010).

Recentemente, diversos pesquisadores têm se dedicado a encontrar alternativas que possam reduzir a produção de CH_4 proveniente do trato digestivo dos animais. Entre as estratégias já observadas, destacam-se a imunização, o controle biológico, os probióticos, a eliminação dos protozoários do rúmen, a utilização de antibióticos e a manipulação e adição de aditivos fitogênicos na dieta dos animais (Castro-montoya et al. 2012).

A adição de fitogênicos é considerada uma forma natural de regular o processo digestivo. Os fitobióticos possuem propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes devido aos seus metabólitos secundários, o que lhes permite modificar a população microbiana no rúmen e potencialmente aumentar a eficiência da produção, reduzindo assim a emissão de metano proveniente do trato digestivo (Calsamiglia et al. 2007; Tawab et al. 2020).

Numerosos estudos mostram que a adição de extratos de plantas ricas em metabolitos secundários como, taninos, saponinas e flavonoides apresentam potencial de mitigação de metano. Segundo Jayanegara et al., 2020, ao adicionar extrato de *Scrophularia striata* - possui atividade antimicrobiana devidos seus compostos bioativos- modulou a fermentação ruminal e diminuiu a produção de metano no rúmen. Assim como, Cherdthong et al. 2019, reportou a diminuição de metano ao suplementar a dieta com pó das folhas de *Piper sarmentosum*, rica em compostos bioativos (alcaloides, flavonoides).

Diante o exposto, a *Acmella oleracea* é uma planta com propriedades medicinais que contém uma variedade de metabólitos secundários, com destaque para o espilantol, um alcaloide (Iamtham et al. 2023).

Portanto, levantou-se a hipótese que a adição de extrato da *Acmella olearacea* devido suas características apresenta potencial para modular a fermentação ruminal e afetar a digestibilidade da matéria seca.

METODOLOGIA

Obtenção do material vegetal

As amostras de jambú (*Acmella oleraceae*) foram obtidas na horta de um pequeno produtor, localizada no bairro da Liberdade no município de Marabá-PA. A produção da hortaliça deste local, é cultivada de forma convencional, ou seja, com uso de fertilizantes. Na produção das mudas utiliza-se a técnica hidropônica com substrato em bandejas. A partir do transplantio das plantas para o canteiro, em torno de 60 dias, foi realizada coleta do material vegetal para estudo.

Produção de gás *in vitro* e digestibilidade da matéria seca

O protocolo de coleta do fluído ruminal foi desenvolvido no laboratório de nutrição animal da universidade Rural da Amazônia (UFRA), localizada no município de Parauapebas, Pará, Brasil (6° 4′25.53″S; 49°48′54.57″W).

A fermentação ruminal foi realizada utilizando o método de Tilley e Terry (1963). O fluido ruminal (inóculo) foi coletado de um bovino fistulado da raça Nelore com massa corporal de aproximadamente 400 kg. O animal foi alimentado durante sete dias por uma ração misturada (concentrado: volumoso = 50:50) contendo forragem de capim Mombaça, farelo de soja, milho e suplemento mineral. No sétimo dia, antes da alimentação matinal, o inóculo foi filtrado em pano de malha fina e armazenado em uma garrafa previamente aquecida (39°C) e injetado CO_2. Em seguida, levado imediatamente ao laboratório e colocado em banho-Maria já aquecido a 39°C.

Antes de realizar a coleta do liquido ruminal, no laboratório, pesou-se 0,5 ± 0,05g de Substrato e transferi-os para frascos de penicilina de 100 mL. Também foi realizado a diluição dos extratos de jambú, utilizando etanol absoluto para obter as concentrações de 3 mg/mL e 30 mg/mL.

A incubação foi realizada em frascos de penicilina de 100mL, contendo: 500mg de substrato, 10 mL de líquido ruminal, 49,5 mL da solução tampão de McDougall (1948), 0,5mL do extrato; pH 6-7. Logo foi obtida dois tratamentos (T3 e o T30) e o controle (T0) (solução que contém o líquido ruminal, a solução tampão e o substrato, mas sem o extrato da planta).

Todos foram preenchidos com dióxido de carbono (CO_2) e vedados com lacres de alumínio. Em cada tratamento foi realizado 5 repetições.

As amostras foram incubadas em três tempos distintos: 6 horas, 12 horas e 24 horas, todas a uma temperatura de 39°C e cinco repetições para cada tempo. Durante a incubação na estufa (Marca:Vulcan; Modelo: EESCRAF-504D), a cada 6h os frascos foram agitados, manualmente, e com o auxílio de uma seringa, retirado o gás produzido pela fermentação.

Este procedimento está descrito na tabela 1.

Após passar o período de incubação de 6, 12 e 24 horas, as misturas foram separadas por filtração à vácuo em cadinhos filtrantes. Em seguida, a massa filtrada foi levada à estufa (Marca: Solab; Modelo: SL-100) por 24 horas a 105°C. Passado o período incubatório, os cadinhos com as amostras foram levados ao dessecador por 25 minutos e pesados.

	Concentração	*Tempo (h)*	*Nº de repetições*
Extrato do jambú	0 mg/g	6	5
		12	5
		24	5
	3,0 mg/g	6	5
		12	5
		24	5
	30,0 mg/g	6	5
		12	5
		24	5

Tabela 1. Dados para análises de DIVMS

Fonte: A autora

Análises de ácidos graxos voláteis

Retirou-se 1 mL da solução filtrante e foi colocado em um microtubo de 2 mL no qual, foi adicionado ácido fosfórico (H_3PO_4) ao filtrante na proporção 1:1 para realizar as análises de ácidos graxos voláteis (AGV). As amostras de AGV foram centrifugadas (4000 rpm x 10 min. em temperatura ambiente) e transferidas para vials de 2 mL, para análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A análise por CLAE foi realizada no Laboratório de Análises Químicas da Faculdade de Química da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará. O equipamento utilizado foi um Cromatógrafo da marca Dionex Ultimate 3000 Dual (Dionex Corporation, Sunnyvale, Ca, USA) equipado com amostrador automático (autosampler) e detector de arranjo de fotodiodos (DAD), o qual coleta espectros na região do ultravioleta e visível, na faixa de 210-600 nm.

A fase estacionária usada foi sílica em uma coluna de C18 (250mm x 4,6mm de diâmetro interno, tamanho das partículas de 5µm). O volume de amostra injetado foi de 25 µL e a temperatura da coluna foi mantida a 30°C. A fase móvel constituiu-se da solução tampão fosfato diácido de sódio (NaH_2PO_4) pH 3 e acetonitrila (ACN), utilizando gradiente exploratório linear. O gradiente foi retornado à concentração inicial em 5 min e mantido por mais 10 min, para o equilíbrio do sistema, antes da injeção da próxima amostra. O fluxo do eluente foi de 1,0 mL/min.

A curva de calibração padrão foi preparada utilizando-se uma mistura de ácidos graxos que continham os ácidos: acético, fórmico, propiônico, butírico, valérico, isovalérico, isocapróicoe capróico. Foi utilizado o ácido adípico como padrão interno. Ao todo foram preparadas sete concentrações (mM/mol): 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8. As análises foram realizadas em triplicatas.

Análises Estatísticas

Os dados coletados do experimento *in vitro* foram analisados usando o procedimento de análise de variância (ANOVA) utilizando o software Rstudio (versão 4.3.1) Diferenças entre meios de tratamentos foram testados usando o teste de Tukey e a significância foi declarada em P < 0,05.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito do extrato de jambú na digestibilidade da matéria seca (DIVMS)

A digestibilidade da matéria seca no período de incubação de 6h e 12h não apresentou diferença entre o controle e os tratamentos (P > 0.05). Já no período de 24h houve alteração na DIVMS. Apresentando uma diferença significativa em relação ao controle (P < 0.05). Os valores na DIVMS variaram entre 56,07 e 63,87. De acordo como tabela 2

PARÂMETRO	6H					
		TRATAMENTO				
	CON	T3	T30	SEM*	P-VALOR CON VS T3	P-VALOR CON VS T30
Digestibilidade (mg/g)	12,01	9,01	10,75	1,12	0,84	0,39
	12H					
Digestibilidade (mg/g)	38,11	38,09	37,48	2,95	1,00	0,88
	24H					
Digestibilidade (mg/g)	63,87	56,07	57,60	2,23	0,01	0,04

* Standard Error of the Mean

Tabela 2. Efeito do estrato de jambú sobre a digestibilidade da matéria seca (DIVMS) no período de incubação de 6, 12 e 24 horas.

Fonte: A autora

Estudos anteriores adicionaram diversas plantas medicinais na dieta para analisar a efetividade na fermentação ruminal, emissão de gás metano, digestibilidade da matéria seca in vitro e a produção de ácidos graxos voláteis. Posto isso, de acordo Grainger et al. 2009 ao adicionar compostos bioativos extraídos da *Acacia mearnsii*, embora tenha apresentando diminuição da produção de metano, houve decréscimo na digestibilidade.

Outros estudos que relataram alteração na digestibilidade da matéria seca quando adicionado plantas medicinais. Segundo Zhang et al. 2022, ao mesmo tempo que houve

aumento da digestibilidade da matéria seca utilizando 1% e 2% de extrato das folhas de *Neolamarckia cadamba*, também ocorria um decréscimo na produção de metano.

A diminuição da digestibilidade da matéria seca pode estar relacionada com a concentração e pH inadequados fornecidas. De acordo com Khiaosa-ard et al. 2020, a dosagem e o pH influenciam na eficiência de suplementos com alcaloides, pois a atividade microbiana é alterada e não a comunidade de micro-organismos.

Análises dos AGV

Através das análises por HPLC da mistura de ácidos graxos pode-se observar no cromatograma, figura 1, a presença de oito ácidos graxos, que em comparação com dados fornecidos por Vargas, 2020, pode-se correlacionar cada um deles com o tempo de retenção (tr), tabela 3.

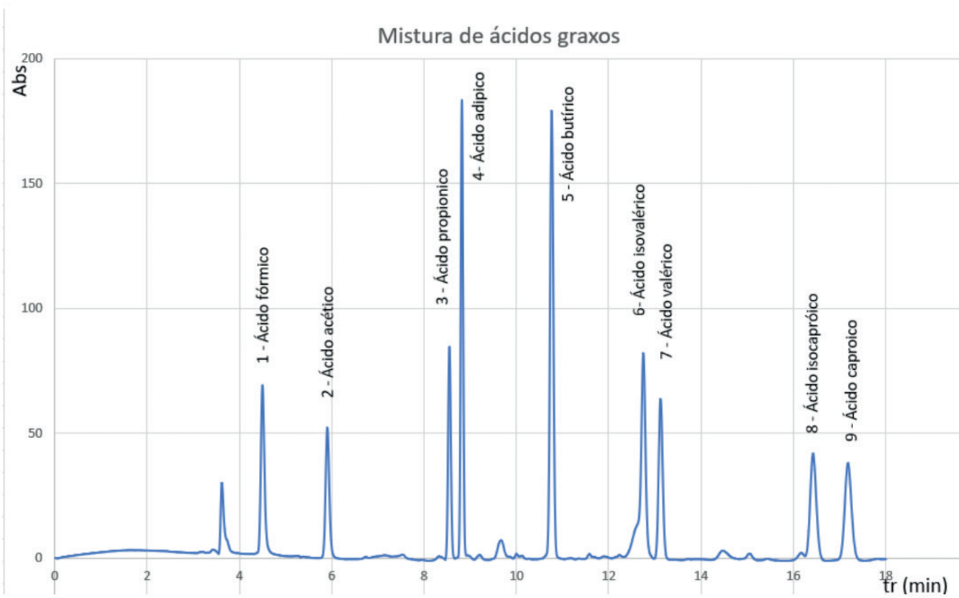


Figura 1. Cromatograma da mistura de ácidos graxos

Fonte: A autora

Pico	Tempo de retenção (tr)	Ácido graxos
01	4,494	ácido fórmico
02	5,897	ácido acético
03	8,547	ácido propionico
04	8,814	ácido adípico*
05	10,76	ácido butírico
06	12,747	ácido isovalérico
07	13,12	ácido valérico
08	16,427	ácido isocapróico
09	17,84	ácido capróico

*padrão interno

Tabela 3. Ácidos graxos e respectivos tempo de retenção obtidos através de HPLC

Fonte: A autora

Através das oito diferentes concentrações analisadas foi possível obter uma curva de calibração para cada um dos ácidos presentes na mistura, todos apresentaram valor de R^2 próximo de 1, significando uma confiabilidade dos dados.

Efeito do extrato de jambú na produção de ácidos graxos voláteis (AGV)

Dentre os produtos finais da fermentação ruminal, os ácidos graxos voláteis correspondem a 70% de energia fornecida ao animal. Os ácidos mais abundantes são: acético, propiônico e butírico, sendo assim, foi realizado uma análise de variância (ANOVA) das as concentrações de acetato, propionato e butirato obtidos das amostras analisadas utilizando-se a curva de calibração referente a cada um deles. Levou-se em considerações duas variáveis, representadas por A = concentração do extrato de jambú; e B = tempo de incubação. Além disso, também foi analisado a interação entre essas variáveis, denominada de AB = *concentração x tempo*. Logo, de acordo com a figura 2, observa-se a interação entre as variáveis descritas e a concentração do jambú não são significativas ($p > 0,05$). Somente o Tempo de incubação mostrou capacidade de influenciar significativamente as concentrações de (A) acetato e (B) propionato ($p < 0,05$). Para o butirato, nenhuma variável influencia na resposta ($p > 0,05$).

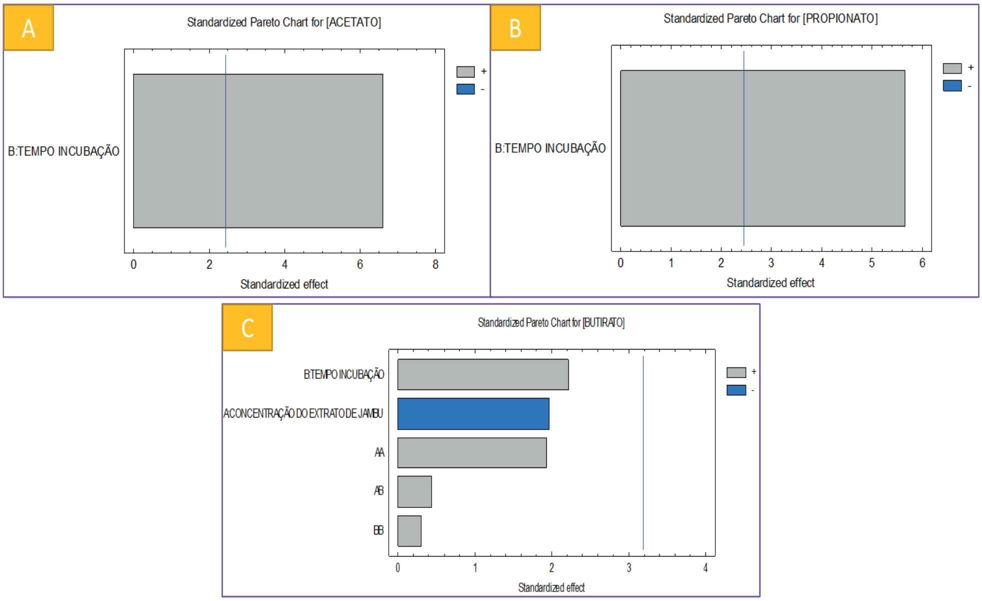


Figura 2. Gráfico de Pareto dos efeitos concentração de jambú [A], Tempo de incubação [B] e interação concentração x tempo (AB) na concentração: (A) Acetato; (B) Propionato; e (C) Butirato

Fonte: A autora

A partir dos dados que se construiu o modelo é possível otimizar as respostas das variáveis, com o intuito de observar qual é o melhor tempo e concentração para melhorar a resposta das concentrações dos AGV. Na figura 3, através do gráfico de superfície de respostas, analisa-se os níveis das variáveis para o aumento da concentração de acetato e propionato, e para ambos foi observado que o melhor tempo de incubação para o aumento da concentração é 24h. Na análise da variável “concentração de extrato” identificou que com ou sem extrato, o efeito é o mesmo. Vale destacar que o tempo e concentração na otimização da concentração de butirato não foi significativo ($p>0,05$), assim não gerou uma resposta de superfície.

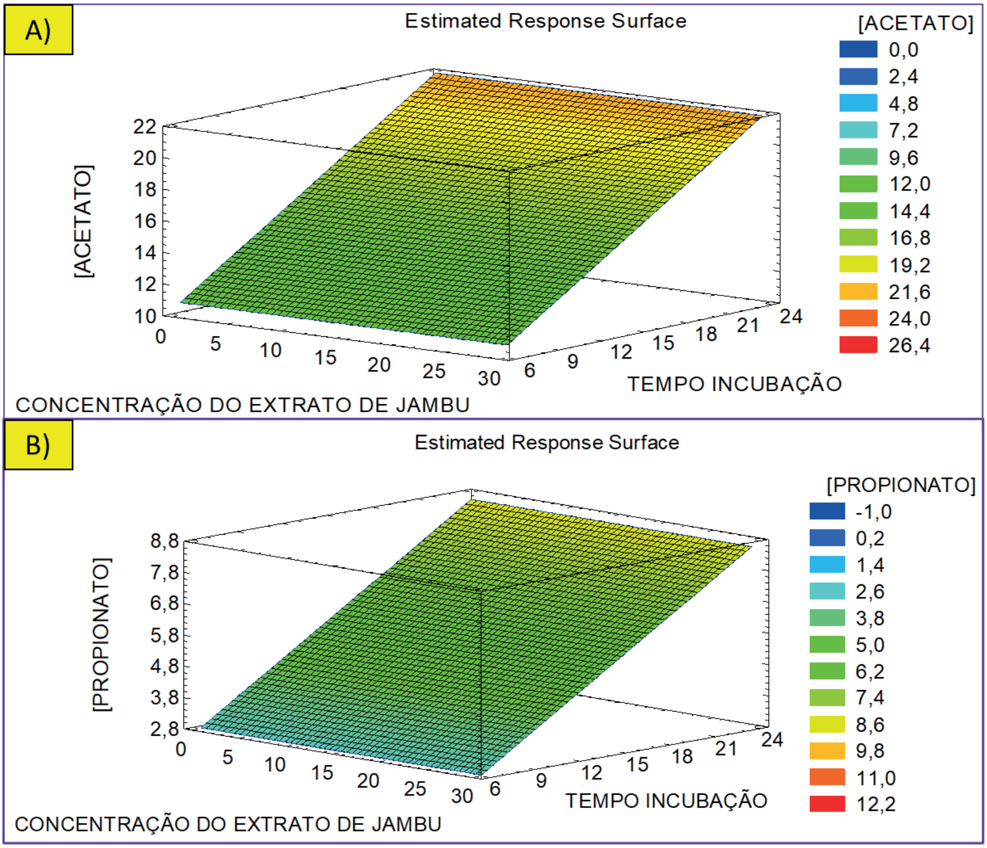


Figura 3. Gráfico de superfície de resposta para o modelo linear mostrando os resultados experimentais para A) concentração de acetato; e B) concentração de propionato.

Fonte: A autora

De acordo com Antonius et al. 2023, observou que ao utilizar *Moringa oleifera, Rhodomyrtus tomentosa, Clerodendron serratum, Curcuma longa Linn., Urena lobata, Uncaria, e Parkia timoriana,* não houve efeito significativo na concentração de propionato e butirato ($p > 0.05$) em relação ao controle. Em contrapartida, as plantas medicinais afetaram, significativamente, a produção de acetato em relação ao controle ($p < 0.05$). Assim como, Cherdthong et al. 2019, ao adicionar *Piper sarmentosum*, uma fonte rica em flavonoides, não houve alteração significativa nas concentrações de acetato, propionato e butirato em relação ao controle ($p > 0,05$).

CONCLUSÃO

A redução das emissões de metano através do uso de plantas medicinais tem sido amplamente estudada por pesquisadores recentemente. Isso levou à investigação do potencial do extrato de jambu na perspectiva de mitigar metano, modulando a fermentação do sistema digestivo de ruminantes.

O extrato etanólico da *Acmella oleracea* nas concentrações e incubação utilizadas, não apresentou efeito significativo na produção dos ácidos graxos vólateis (acetato, propionato e butirato). Em relação a digestibilidade da matéria seca, tanto nas concentrações de 3mg/mL como de 30 mg/mL foi observado um decréscimo no tempo de incubação de 24h, ou seja, um efeito negativo na digestibilidade.

A utilização do extrato de *Acmella oleracea* como suplemento é pioneiro, logo necessita-se procurar novos parâmetros, como analisar o pH, a produção de proteína microbiana, produção gás total e N-amoniacal; identificar as comunidades dos micro-organismo. Além disso, otimizar as concentrações e tempo de incubação para uma melhor avaliação da fermentação ruminal.

REFERÊNCIAS

ANTONIUS, Antonius et al. Effectiveness of herbal plants on rumen fermentation, methane gas emissions, in vitro nutrient digestibility, and population of protozoa. **Veterinary World**, v. 16, n. 7, p. 1477, 2023.

ALEMU, Aklilu W. et al. Rumen stoichiometric models and their contribution and challenges in predicting enteric methane production. **Animal Feed Science and Technology**, v. 166, p. 761-778, 2011.

BEAUCHEMIN, Karen A.; MCGINN, Sean M.; PETIT, Hélène V. Methane abatement strategies for cattle: Lipid supplementation of diets. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 87, n. 3, p. 431-440, 2007.

BEAUCHEMIN, Karen A. et al. Fifty years of research on rumen methanogenesis: Lessons learned and future challenges for mitigation. **Animal**, v. 14, n. S1, p. s2-s16, 2020.

BANCO MUNDIAL. World Development Indicators Database **População, total (2022)** Disponível: https://data.worldbank.org/indicator/SP.POP.TOTL. Acesso em: 27 jan. 2024.

CALSAMIGLIA, Sergio. et al. Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. **Journal of dairy science**, v. 90, n. 6, p. 2580-2595, 2007.

CASTRO-MONTOYA, Joaquin et al. Interactions between methane mitigation additives and basal substrates on in vitro methane and VFA production. **Animal Feed Science and Technology**, v. 176, n. 1-4, p. 47-60, 2012.

CHANG, Jinfeng et al. The key role of production efficiency changes in livestock methane emission mitigation. **AGU Advances**, v. 2, n. 2, p. e2021AV000391, 2021.

Climate Watch Historical GHG Emissions. 2022. **Washington, DC: World Resources Institute**. Disponível em https://www.climatewatchdata.org./countries/BRA?end_year=2020&start_year=1990#ghg-emissions. Acesso em: 24 jan 2024.

DE PAULA, Kelvin Gabriel Sant Anna et al. Emissão de metano na pecuária: relação causa-efeito e mecanismos modulatórios. **Pubvet**, v. 13, p. 148, 2019.

EMBRAPA. **Estudos socioeconômicos e ambientais**. Disponível em: https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/73611968/brasil-pode-superar-a-india-em-2023-na-producao-de-graos. Acesso em: 22 jan. 2024.

EPA. **Greenhouse Gas Emissions**. Disponível em: https://www.epa.gov/ghgemissions/global-greenhouse-gas-emissions-data. Acesso em: 23 jan. 2024.

HERRERO, Mario et al. Livestock and the environment: what have we learned in the past decade?. **Annual Review of Environment and Resources**, v. 40, p. 177-202, 2015.

IPCC. Intergovernmental Panel On Climate Change. **Climate Change 2014: Synthesis Report**. PACHAURI, R.K and MEYER, L. A. (eds.). *Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* IPCC, Geneva, Switzerland, 151 pp.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatistica. **Pesquisa de Pecuária municipal (2022).** Disponível em: https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?=&t=destaques. Acesso em: 22 jan. 2024.

JANSSEN, Peter H. Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. **Animal Feed Science and Technology**, v. 160, n. 1-2, p. 1-22, 2010.

JAYANEGARA, Anuraga et al. Combination effects of plant extracts rich in tannins and saponins as feed additives for mitigating in vitro ruminal methane and ammonia formation. **Animals**, v. 10, n. 9, p. 1531, 2020.

KHIAOSA-ARD, Ratchaneewan et al. Physicochemical stressors and mixed alkaloid supplementation modulate ruminal microbiota and fermentation in vitro. **Anaerobe**, v. 65, p. 102263, 2020.

KUMAR, Sanjay et al. Factors affecting rumen methanogens and methane mitigation strategies. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 1557-1566, 2009.

KUMAR, Sumit et al. Role of Plant Secondary Metabolites in Defence and Transcriptional Regulation in Response to Biotic Stress. **Plant Stress**, p. 100154, 2023.

MACHADO, Fernanda. S. et al. Emissões de metano na pecuária: conceitos, métodos de avaliação e estratégias de mitigação. 2011.

MARTIN, Cecile; MORGAVI, Diego P.; DOREAU, Michel. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. **Animal**, v. 4, n. 3, p. 351-365, 2010.

McALLISTER, T.A.; NEWBOLD, C.J. Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.48, n.2, p.7-13, 2008

MCCANN, Joshua C.; ELOLIMY, Ahmed A.; LOOR, Juan J. Rumen microbiome, probiotics, and fermentation additives. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 33, n. 3, p. 539-553, 2017.

McDOUGALL, E. I. 1948. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. **Biochem**. J. 43:99- 109.

MOMBACH, Mircéia Angele et al. Emissão de metano entérico por bovinos: o que sabemos e que podemos fazer. In: **Embrapa Agrossilvipastoril-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. 2016. p. 181-202.

NOSCHANG, Joana Piagetti; BRAUNER, C. C. Saccharomyces cerevisae na nutrição de ruminantes: Revisão. **Pubvet**, v. 13, n. 2, p. 1-8, 2019.

PINTO, Talita. P. et al. Panorama das emissões de metano e implicações do uso de diferentes métricas. **Observatório de Conhecimento e Inovação em Bioeconomia, Fundação Getúlio Vargas** - FGV-EESP, São Paulo, SP, Brasil. 2022.

NASCIMENTO, Luis Eduardo Silva et al. Phytochemical profile of different anatomical parts of jambu (Acmella oleracea (L.) RK Jansen): A comparison between hydroponic and conventional cultivation using PCA and cluster analysis. **Food Chemistry**, v. 332, p. 127393, 2020.

RONDANELLI, Mariangela et al. Acmella oleracea for pain management. **Fitoterapia**, v. 140, p. 104419, 2020.

SEEG. **Sistema de Estimativas de Emissões de Gases de Efeito Estufa**. Disponível em: www.seeg.eco.br . Acesso em: 22 jan. 2024.

SHARMA, Rahul; ARUMUGAM, Neelakantan. N-alkylamides of Spilanthes (syn: Acmella): structure, purification, characterization, biological activities and applications–A review. **Future Foods**, v. 3, p. 100022, 2021.

THIRUMURUGAN, Durairaj et al. An introductory chapter: secondary metabolites. **Secondary metabolites-sources and applications**, p. 3-21, 2018.

TILLEY, J. M. A., & TERRY, R. A. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. **Grass and forage science**, 18(2), 104-111, 1963

UTHPALA, T. G. G.; NAVARATNE, S. B. Acmella oleracea plant; identification, applications and use as an emerging food source–review. **Food Reviews International**, v. 37, n. 4, p. 399-414, 2021.

ZHANG, Qing et al. Effects of Neolamarckia cadamba leaves extract on methanogenesis, microbial community in the rumen and digestibility of stylo silage. **Journal of Cleaner Production**, v. 369, p. 133338, 2022.

WANG, M. et al. Responses of methane production and fermentation pathways to the increased dissolved hydrogen concentration generated by eight substrates in in vitro ruminal cultures. **Animal Feed Science and Technology**, v. 194, p. 1-11, 2014..

WANG, Kun; XIONG, Benhai; ZHAO, Xin. Could propionate formation be used to reduce enteric methane emission in ruminants?. **Science of the Total Environment**, v. 855, p. 158867, 2023.

CAPÍTULO 7

UMA ANÁLISE EMPREGANDO A TEORIA DO FUNCIONAL DA DENSIDADE E DOCKING MOLECULAR DAS PROPRIEDADES ELETRÔNICAS, ESTRUTURAIS, VIBRACIONAIS E ÓPTICAS DA FENFORMINA

Data de submissão: 06/03/2024 *Data de aceite: 03/06/2024*

Jocelia Silva Machado Rodrigues
Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Sergipe, São Cristovão, Sergipe.
https://orcid.org/0000-0002-3400-948X

Fernanda Carla Lima Ferreira
Faculdade de Física, Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, Marabá, Pará.
https://orcid.org/0000-0002-1671-533X

Glaura Caroena Azevedo de Oliveira
Faculdade de Física, Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, Marabá, Pará, Brazil.
https://orcid.org/0000-0002-7560-2386

Rosangela Dala Possa
Faculdade de Química, Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, Marabá, Pará.
https://orcid.org/0000-0001-8293-1682

Sidnei Cerqueira Dos Santos
Laboratório de Bioensaios e Bioprocesos (L@βio), Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará (Unifesspa) Marabá - Pará
https://orcid.org/0000-0003-1169-256X

Giselle Barata Costa
Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, Marabá, Pará.
https://orcid.org/0000-0003-2339-8755

Divanizia do Nascimento Souza
Departamento de Física, Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, Sergipe.
https://orcid.org/0000-0001-9634-7380

Érico Raimundo Pereira de Novais
Faculdade de Física, Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, Marabá, Pará.
https://orcid.org/0000-0002-3669-9082

Alzeir Machado Rodrigues
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, Acopiara, Ceará.
https://orcid.org/0000-0002-8968-9611

Andréa de Lima Ferreira Novais
Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, Marabá, Pará.
https://orcid.org/0000-0002-0573-288X

Aldimar Machado Rodrigues
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, Boa Viagem, Ceará.
https://orcid.org/0000-0002-0864-8552

Willian Oliveira Santos
Programa de Pós-graduação em Física Centro de Ciências e Tecnologia Universidade Federal de Sergipe Aracajú-Sergipe
https://orcid.org/0000-0002-6952-9872

RESUMO: A organização mundial da saúde informa que o diabetes se tornará a sétima causa de morte mais frequente no mundo, até 2030. Estudos quantitativos sobre a distribuição dos fenômenos de saúde/doença oncológica e da diabetes mellitus tipo 2 sugerem que existe uma associação entre estas duas doenças crônicas que representam um grande desafio para os sistemas de saúde global. Neste trabalho, as propriedades eletrônicas, estruturais, vibracionais e ópticas da fenformina oral da classe das biguanidas na fase gasosa e em ambiente aquoso descritas com um modelo contínuo polarizável foram investigadas usando a teoria do funcional da densidade e *docking molecular*. A absorção ultravioleta-visível e infravermelha da fenformina em ambiente simulado com água apresentou alterações nas transições eletrônicas para altas frequências, quando comparado com o meio gasoso, levando à estabilidade da estrutura energética. Cálculos relacionados aos orbitais entre a banda de valência mais alta ocupada e a banda de condução mais baixa desocupada mostraram que a fenformina possui uma ampla energia de *band gap* indicando que o material pode ser estável e isolante. Os resultados do *docking molecular* mostraram que a fenformina tende a se ligar espontaneamente ao receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (ErbB2), destacando a importância da fenformina como um possível medicamento que inibe o crescimento de células de câncer de mama.
PALAVRAS-CHAVE: Ferformina, DFT, *Docking Molecular*, Câncer de Mama.

DFT AND MOLECULAR DOCKING CALCULATIONS TO STUDY ELECTRONIC, STRUCTURAL, VIBRATIONAL AND OPTICAL PROPERTIES OF THE ORAL ANTIDIABETIC DRUG PHENFORMIN

ABSTRACT: The world health organization reports that diabetes will become the seventh most frequent cause of death in the world, by 2030. Quantitative studies of the distribution of health phenomena/cancer disease and type 2 diabetes mellitus suggest that there is an association between these two chronic diseases that represent a major challenge for global health systems. In this work, the electronic, structural, vibrational and optical, properties of oral phenformin of the biguanide class in the gas phase and in an water-simulated environment described with a polarizable continuum model were investigated using density functional theory and molecular docking. Ultraviolet-visible and infrared absorption of phenformin in an water-simulated environment showed changes in electronic transitions to high frequencies, when compared to the gaseous medium, leading to the energetic structure stability. Calculations related to the orbitals between the highest occupied valence band and the lowest unoccupied conduction band showed that phenformin has a broad band gap indicating that the material can be stable and insulating. The molecular docking results showed that phenformin tends to spontaneously bind to human epidermal growth factor receptor 2 (ErbB2), highlighting the importance of phenformin as a possible drug that inhibits the growth of breast cancer cells.
KEYWORDS: Pherformin, DFT, Molecular Docking, Breast Cancer.

INTRODUÇÃO

As biguanidas formam uma família de compostos com aplicações clínicas no controle da hiperglicemia, como fenformina, metformina, além de medicamentos antimaláricos, antissépticos e antivirais [1]. A fenformina e a metformina são exemplos de medicamentos antidiabéticos orais (biguanidas) convenientemente sintetizados em uma reação química de etapa única. Estes medicamentos para diabetes têm aplicações terapêuticas em diversos tipos de câncer [2]. Há diversos marcadores biológicos comuns entre pacientes com diabetes e câncer, como níveis elevados de peptídeo C, resistência à insulina, hiperativação do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1), efeito mitogênico da insulina, leptina, baixo nível de adiponectina em um ambiente pró-inflamatório. Esses indicadores contribuem para uma associação entre essas condições [2].

Estudos apontam para a importância do uso da fenformina como agente antineoplásico [3]. Agentes antineoplásicos são medicamentos usados para inibir o crescimento acelerado de células cancerígenas. Esse tipo de medicamento começou a ser estudado e utilizado no final do século XIX, e seu uso aumentou ainda mais nos últimos anos devido ao aumento do diagnóstico da neoplasia [4, 5]. Descobertas importantes têm ocorrido para o desenvolvimento de medicamentos com atividade anticancerígena, principalmente devido aos avanços feitos na descoberta e distribuição de medicamentos [6, 7]. A fenformina pode ser considerada um avanço, pois esse medicamento tem potencial de letalidade em linhagens celulares de câncer cinquenta vezes maior que a metformina, outra biguanida [2, 6, 7, 8].

Guo et al. [9] estudaram o uso da fenformina como inibidor do crescimento de células de câncer de mama com superexpressão do HER2/neu (receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano), conhecido também como ErbB2 (proteína presente em alguns casos de câncer de mama que torna os tumores mais resistentes aos tratamentos terapêuticos). O estudo foi realizado *in vitro* e *in vivo* em ratos e, segundo os autores, a fenformina, dependendo da dosagem, inibiu em ambos os casos o crescimento de células cancerígenas conforme mencionado. Krishnamurthy et al. (2014) [8] realizaram estudos *in vivo* realizados em ratos camundongos com câncer de pulmão humano (H460) tratados com fenformina e demonstraram que este medicamento atuou como um antitumoral eficaz, não causando danos hepáticos.

Na pesquisa realizada por Caraci et al. [3] a fenformina e a metformina (biguanida que substituiu a fenformina no tratamento do diabetes) foram estudadas como inibidores de células cancerígenas da próstata. O estudo apontou a eficiência da fenformina em algumas concentrações com diferentes variações no tempo, enquanto a metformina se mostrou ineficaz.

Devido à urgência no combate ao câncer de mama, neste trabalho investigamos as propriedades eletrônicas, estruturais, vibracionais, ópticas e a afinidade de interação entre o receptor de fenformina do fator de crescimento epidérmico humano 2 (ErbB2).

DETALHES COMPUTACIONAIS

Os cálculos foram realizados usando a Teoria do Funcional da Densidade (DFT) com o funcional híbrido B3LYP (função de troca com três parâmetros de Becke [10] combinados com a função de correlação de Lee, Yang e Parr [11]) e a Aproximação de Gradiente Generalizada (GGA) em um conjunto base 6-31+G(d,p). Como primeiro passo, as coordenadas atômicas que formam uma fenformina foram construídas usando o software de modelagem Avogadro 1.2.0 [12]. Em seguida, foram gerados arquivos de entrada para o *software* Gaussian 09 [13], que realiza cálculos *Ab Initio* e descreve a troca e correlação de energia de estruturas em ambiente gasoso e aquoso. Após este processo, as geometrias moleculares da estrutura foram otimizadas, inicialmente na fase gasosa. A quarta etapa foi calcular as frequências Infravermelhas (IR), espectros Ultravioleta-Visíveis (UV-Vis), Potenciais Eletrostáticos Moleculares (MEPs) e Orbitais Moleculares de Fronteira (FMOs). Por fim, a estrutura previamente otimizada na fase gasosa foi colocada em um ambiente aquoso e reotimizada.

Para calcular as frequências IR e UV-Vis da fenformina em ambiente aquoso foi utilizado o Modelo Contínuo Polarizável (PCM) [14] no Campo de Reação Autoconsistente (SCRF) [15], que considera um potencial de interação implícito entre o soluto e o solvente. Ambos os ambientes (gasoso e aquoso) tiveram suas configurações mínimas de energia calculadas. Para o *docking molecular*, a estrutura proteica do domínio extracelular do HER2/neu (receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano), conhecido também como ErbB2 foi caracterizada por Difração de Raios X (DRX) com resolução de 3,25 Å [16] obtida no Protein Database [17] (http:// www.rcsb.org).

O UCSF Chimera [18] foi utilizado para realizar o ajuste entre ErbB2 com hidrogênios e cargas elétricas negativas e ligantes da fenformina. O AutoDock Vina [19] foi utilizado para realizar o *docking* entre ErbB2 e fenformina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Propriedades estruturais e eletrônicas

As Figuras 1a e 1b mostram as estruturas da fenformina otimizadas em ambiente gasoso e aquoso, respectivamente. O funcional híbrido B3LYP/6-31++G (d,p) foi usado para a realização dos cálculos. A Figura 1a e 1b e a Tabela 1 mostram uma comparação entre as rotações dos ângulos diédricos dos átomos de nitrogênio na fenformina em meio gasoso e aquoso. Quando imersa em água, a fenformina sofre o efeito de solvatação que provoca rotações nos ângulos diédricos da região do nitrogênio, em relação à fase gasosa.

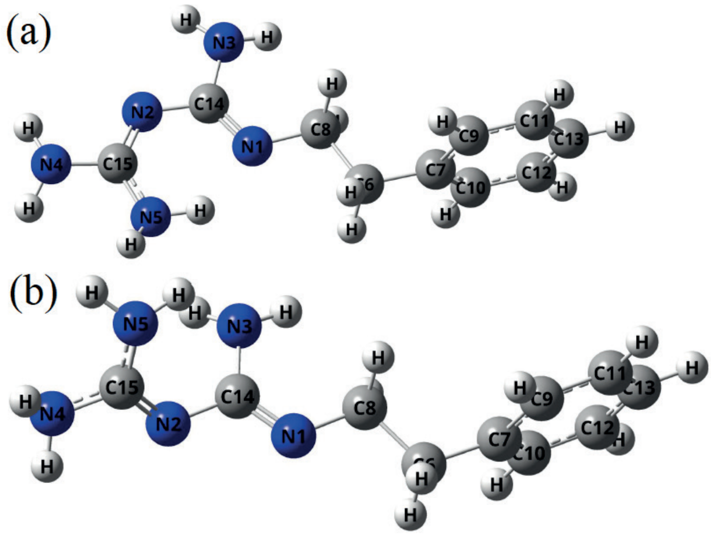


Figura 1: Estruturas da fenformina otimizadas. Em (a) em fase gasosa. Em (b) ambiente aquoso.

Ambiente	C_{14}-N_2-C_{15}-N_5	C_8-N_1-C_{14}-N_3	N_3-C_{14}-N_2-C_{15}
Gasoso	-8,08°	-0,04°	-172,70°
Aquoso	-8,45°	-3,25°	-52,01°

Tabela 1: Ângulos diédricos da região de nitrogênio da fenformina.

Mapa de potencial eletrostático e orbitais moleculares de fronteira

As Figuras 2a e 2b mostram os Mapas de Potencial Eletrostático (MEP_S) em diferentes ângulos e os limites dos Orbitais Moleculares de Fronteira (FMOs) da fenformina, respectivamente. Os MEPs e os FMOs foram calculados na fase gasosa, usando o método B3LYP.

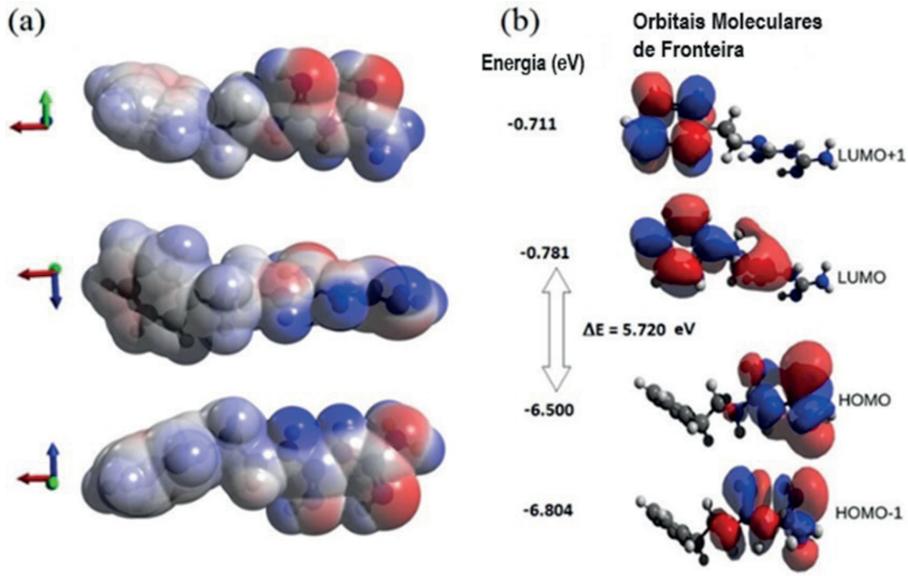


Figura 2: (a) MPEs da molécula de fenformina na fase gasosa vistos de diferentes ângulos. (b) FMOs da molécula de fenformina em fase gasosa.

O vermelho mostrado na Figura 2a representa o potencial eletrostático mais eletronegativo com intensa repulsão. O azul indica o potencial mais eletropositivo com forte atração, enquanto o branco mostra que as regiões apolares. A Figura 2a mostra ainda que as cargas elétricas negativas estão nas regiões que circundam os átomos de nitrogênio (=NH e $-NH_2$) e as descargas elétricas positivas circundam os átomos de hidrogênio e nitrogênio (NH).

O orbital molecular ocupado de maior energia (HOMO) doa elétrons para ocupar os orbitais ligantes e realizar interações. O orbital molecular desocupado de menor energia (LUMO) recebe elétrons doados por um ligante e favorece a formação da ligação [22]. A Figura 2 (b) mostra que os orbitais moleculares mais alto ocupados (HOMO-1 e HOMO) estão distribuídos na região nitrogenada da molécula de fenformina na fase gasosa. Os orbitais moleculares mais baixo desocupados (LUMO e LUMO+1) estão distribuídos principalmente no anel aromático da molécula e LUMO na região nitrogenada. A energia de *band gap* calculada entre os orbitais HOMO e LUMO foi de ($\Delta E_{HOMO\text{-}LUMO}$=5,720 eV), esse valor mostra que a molécula é quimicamente estável [23] e isolante [22].

Espectroscopia vibracional

Análises vibracionais usando espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) fornecem detalhes sobre as interações intermoleculares envolvidas, dando origem a cada uma das bandas observadas em números de onda específicos.

A Figura 3a e 3b mostram os espectros FT-IR calculados da fenformina, em fase gasosa e meio aquoso, respectivamente. Os espectros foram obtidos entre 0-4000 cm^{-1} usando o funcional híbrido B3LYP/6-31++G(d,p).

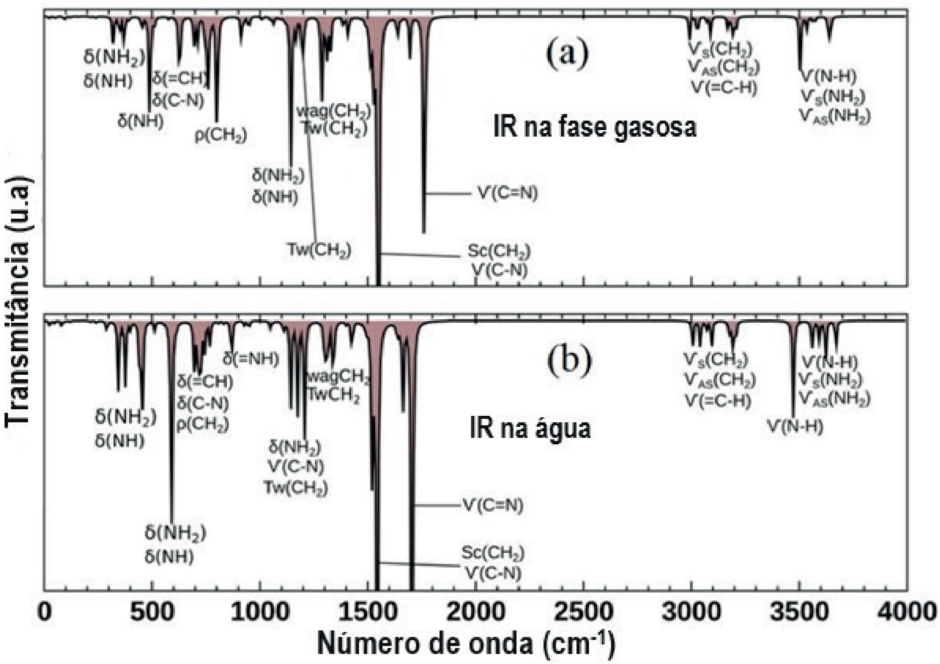


Figura 3: Espectro de transmissão infravermelha (IR) da fenformina calculado na fase gasosa e meio aquoso usando B3LYP/6-31++G(d,p).

Apresentaram bandas de deformação angular dos grupos NH^2, NH, δNH_2 e δ(NH). Na fase gasosa (Fig. 3a) foram observadas as bandas relacionadas à deformação ρ(CH2) em 500 cm^{-1} e aproximadamente 810 cm^{-1} e as deformações δ(=NH) e δ(C-N) apresentaram uma banda em torno de 600 cm^{-1}. Em ambiente aquoso (Fig. 3b), a deformação $\rho(CH_2)$ foi observada próximo a 580 cm^{-1} e em 770 cm^{-1} e as deformações δ(=NH) e δ(C-N) em aproximadamente 700 cm^{-1}. A banda (N-H), em fase gasosa, foi observada em 3504 cm^{-1} enquanto, em ambiente aquoso, em 3473 cm^{-1}. A Figura 3a mostra ainda, bandas de $\rho(CH_2)$, v(C=N) e v(N-H) que aparecem em ambiente aquoso com frequências ligeiramente inferiores ao observados na fase gasosa. Uma explicação teórica para esse fato pode ser atribuída à possibilidade de que, em um ambiente aquoso, certas ligações covalentes intramoleculares da fenformina se tornam menos rígidas e passam a vibrar em frequências mais baixas. A Figura 3a revela bandas de $\rho(CH_2)$, v(C=N) e v(N-H) que são observadas em ambiente aquoso com frequências ligeiramente inferiores às observadas na fase gasosa. Uma explicação teórica para esse fenômeno pode ser associada à ideia de que, em um ambiente aquoso, algumas das ligações covalentes intramoleculares da fenformina tornam-se menos rígidas, resultando em vibrações em frequências mais baixas.

As localizações e aspectos da banda de transmissão nos espectros de IR (Fig. 3a e 3b) assemelham-se aos resultados relatados na literatura para compostos pertencentes ao grupo das biguanidas e, portanto, estruturalmente semelhantes à fenformina [24,25]. O espectro IR calculado em ambiente aquoso (Fig. 3b) é semelhante experimental da O-tolil biguanida, substância com estrutura análoga à fenformina, adquirida do banco de dados espectrofotométrico de materiais Spectra Base [26]. Esta semelhança mostra que o método teórico utilizado é confiável.

Espectroscopia ultravioleta-visível

As Figuras 4a e 4b mostram os espectros de absorção óptica da fenformina. Os espectros foram calculados na região Ultravioleta-Visível (UV-Vis) em fase gasosa obtidos entre 180 a 250 nm (Fig. 4a) e em ambiente aquoso de 170 a 240 nm (Fig. 4b) ambos espectros foram calculados usando o funcional híbrido B3LYP/6-31++G(d,p).

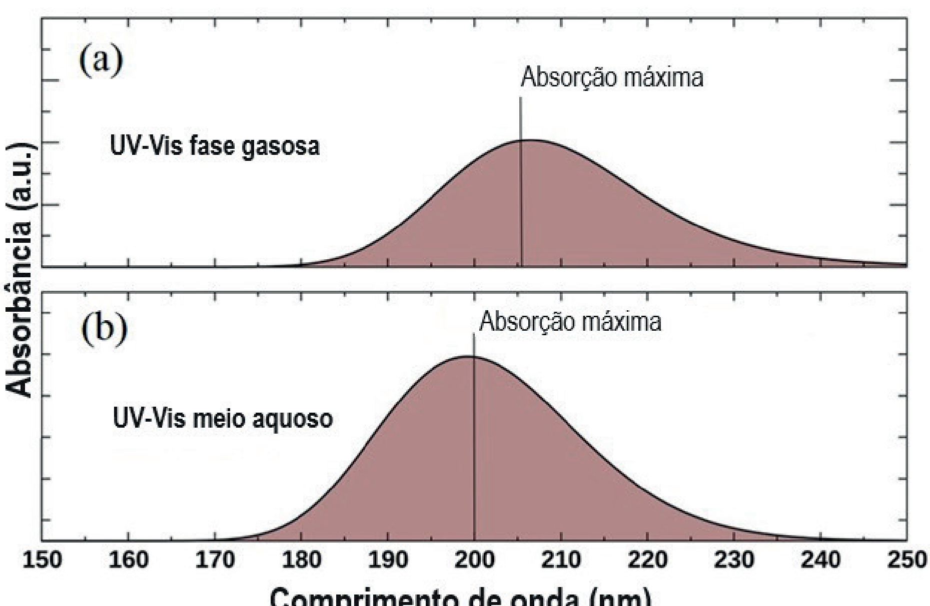


Figura 4: Espectros de absorção do UV-Vis para fenformina. Em (a) fase gasoso. Em (b) meio aquoso.

As Figuras 4a e 4b mostram que o pico de absorção UV-Vis da fenformina na fase gasosa ocorreu em aproximadamente 205 nm e no meio aquoso em 200 nm, respectivamente. A partir destes resultados, é possível observar que, em ambiente aquoso, há uma alteração nas transições eletrônicas da fenformina para altas frequências, tornando-as energeticamente mais estáveis.

O espectro UV-Vis da fenformina mostrado na Fig. 4, calculado na fase gasosa, foi comparado com o UV-Vis do O-Tolil Biguanidato. A absorção máxima da radiação UV-Vis observada na O-Tolil Biguanida ocorre em torno de 205 nm, resultado semelhante ao obtido para a fenformina na fase gasosa no presente trabalho.

As Figuras 5 (a), (b) e a Tabela 2 mostram, respectivamente, as transições eletrônicas e as energias envolvidas nos primeiros cinco estados excitados da fenformina em ambiente gasosa e aquoso. As transições HOMO-LUMO (55-56) da fenformina na fase gasosa ocorrem no 1°, 3° e 4° estados de excitação, enquanto em ambiente simulado de água ocorrem no 2° e 5° estados de excitação.

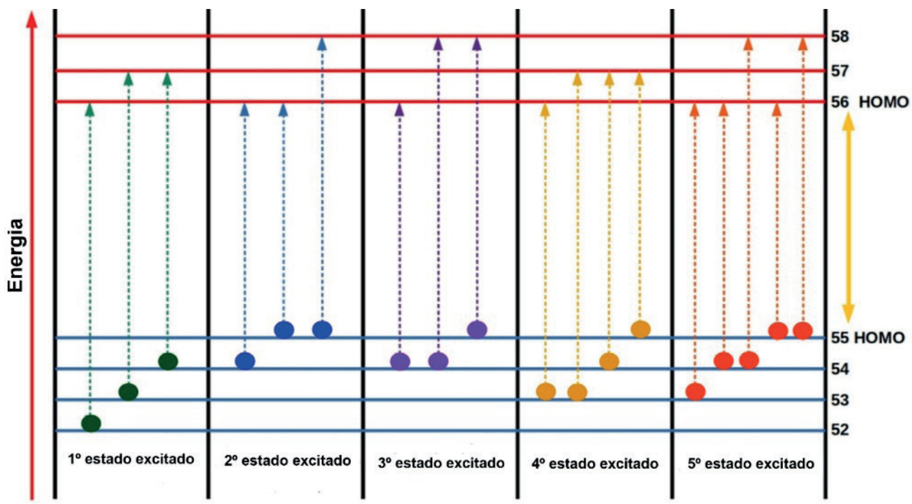


Figura 5: Transições eletrônicas dos primeiros cinco estados excitados da fenformina. Em (a) fase gasosa com, 51=HOMO-4, 52=HOMO-3, 53=HOMO-2, 54=HOMO-1, 55=HOMO, 56=LUMO, 57=LUMO+1, 58=LUMO+ 2, 59=LUMO+3. Em (b) meio aquoso com, 52=HOMO-3, 53=HOMO-2, 54=HOMO-1, 55=HOMO, 56=LUMO, 57=LUMO+1, 58=LUMO+2.

Ambiente	EES1	EES2	EES3	EES4	EES5
Gasoso	5,19	5,28	5,40	5,40	5,45
Aquoso	5,29	5,68	5,76	5,80	5,86

Tabela 2: Energias dos Estados Excitados (EES), em eV, da fenformina em fase gasoso e meio aquoso.

Docking molecular

O *Docking molecular* é uma técnica que busca possíveis orientações geométricas para realizar a ligação de um ligante a uma macromolecular. As interações ligante-proteína estão envolvidas em muitos processos biológicos com implicações farmacocinéticas.

A Figura 6 mostra a proteína ErbB2 que é formada pela combinação de seis cadeias polipeptídicas identificadas em ordem alfabética de A a F.

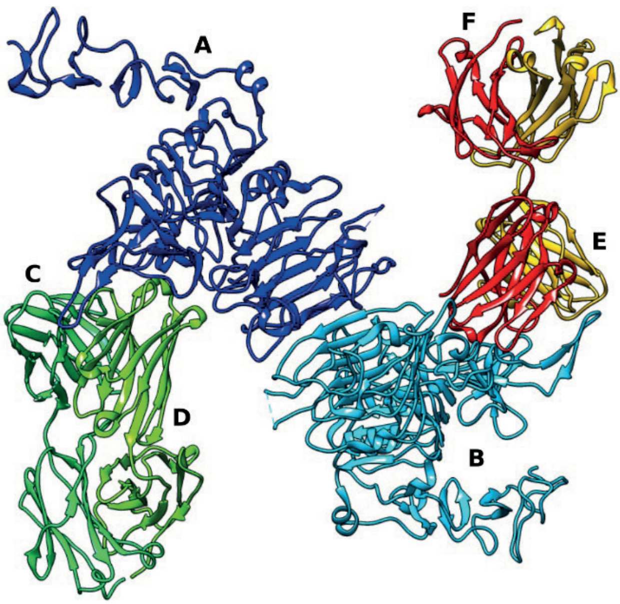


Figura 6: Seis cadeias polipeptídicas formando a estrutura quaternária do domínio extracelular do receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (ErbB2).

A Tabela 3 mostra as dez regiões com maior probabilidade de ocorrer *docking* entre fenformina e proteína ErbB2, energia de ligação e as raízes dos desvios quadráticos médios do limite inferior (RMSD lb) e limite superior (RMSD u.b.).

Regiões	Energia (kcal/mol)	RMSD l.b.	RMSD u.b.
a	-6,7	0,00	0,00
b	-6,3	2,41	3,30
c	-6,6	12,87	14,68
d	-6,6	18,74	20,83
e	-6,6	19,19	21,42
f	-6,4	33,39	34,50
g	-6,3	54,19	55,37
h	-6,6	54,34	55,60
i	-6,5	62,54	64,16
j	-6,5	69,71	72,27

De acordo a Tabela 3, as energias de ligação calculadas estão na faixa entre -6,3 e -6,7 kcal/mol. Os valores negativos sugerem que o *docking* entre fenformina e ErbB2 ocorre de forma espontânea, ou seja, os complexos são estáveis. Na região **b**, o segundo ajuste mais favorável, possui maior energia que as demais com exceção do *docking* em **g**, mas é um processo muito favorecido devido aos baixos valores de RMSD lb. e RMSD u.b. O RMSD mede as distâncias interatômicas entre a estrutura gerada e a estrutura do molde [27].

As Figuras 7**a-j** mostram o *docking* entre fenformina e ErbB2 em dez regiões diferentes. Em **a**, **b** e **c**, o *docking* da fenformina na proteína ErbB2 ocorreu na região A da cadeia polipeptídica e estabeleceu uma ligação de hidrogênio de 1,94 Å com um resíduo de Valina (Val), 2,17 Å com um resíduo de Glicina (Gly) e 1,98 Å com um resíduo de Glicina (Gly) e 1,98 Å com um resíduo de Alanina (Ala), respectivamente. Em **d** o *docking* da fenformina (ligante) na proteína ErbB2 (receptor) ocorreu na região da cadeia polipeptídica A e B com resíduos próximos a Alanina (Ala), Treonina (Thr), Leucina (Leu) e Serina (Ser). Nesta região não foram observadas ligações de hidrogênio entre o ligante e o receptor. Na Figura 7**e**, o *docking* da fenformina (ligante) na proteína ErbB2 (receptor) ocorreu na região da cadeia polipeptídica A e B, onde há uma ligação de hidrogênio de 1,94 Å com a molécula de fenformina e um resíduo de histidina (His) da cadeia A. Região formada principalmente pelas cadeias polipeptídicas A e B e que estabeleceu ligações de hidrogênio de 3,56 Å com resíduo de Glutamina (Glu) da cadeia A, 2,38 Å com resíduo de arginina (Arg) da cadeia B e 2,53 Å de resíduo de asparagina (Asn) da cadeia B. Na Figura 7**g** o *docking* entre o ligante e o receptor ocorreu em uma região formada pela cadeia polipeptídica C e estabeleceu uma ligação de hidrogênio de 2,24 Å com o resíduo Prolina (Pro). Na Figura 7**h** o *docking* entre o ligante e o receptor ocorreu em uma região formada principalmente pelas cadeias polipeptídicas C e B e os resíduos de aminoácidos mais próximos foram o Glutamato (Glu), Leucina (Leu) e Prolina (Pro). Nesta região não foram observadas ligações de hidrogênio entre o ligante e o receptor. Na Figura 7**i** o *docking* entre a fenformina e a proteína ErbB2 ocorreu na região da cadeia polipeptídica B e estabeleceu uma ligação de hidrogênio de 2,41 Å com um resíduo de Leucina (Leu). Finalmente, a Figura 7**j** mostra que o *docking* entre fenformina e proteína ocorreu nas regiões das cadeias polipeptídicas E e F que estabeleceram ligações de hidrogênio de 2,03 Å com resíduo de Lisina (Lys) e 2,46 com resíduo de Glicina (Gly), respectivamente.

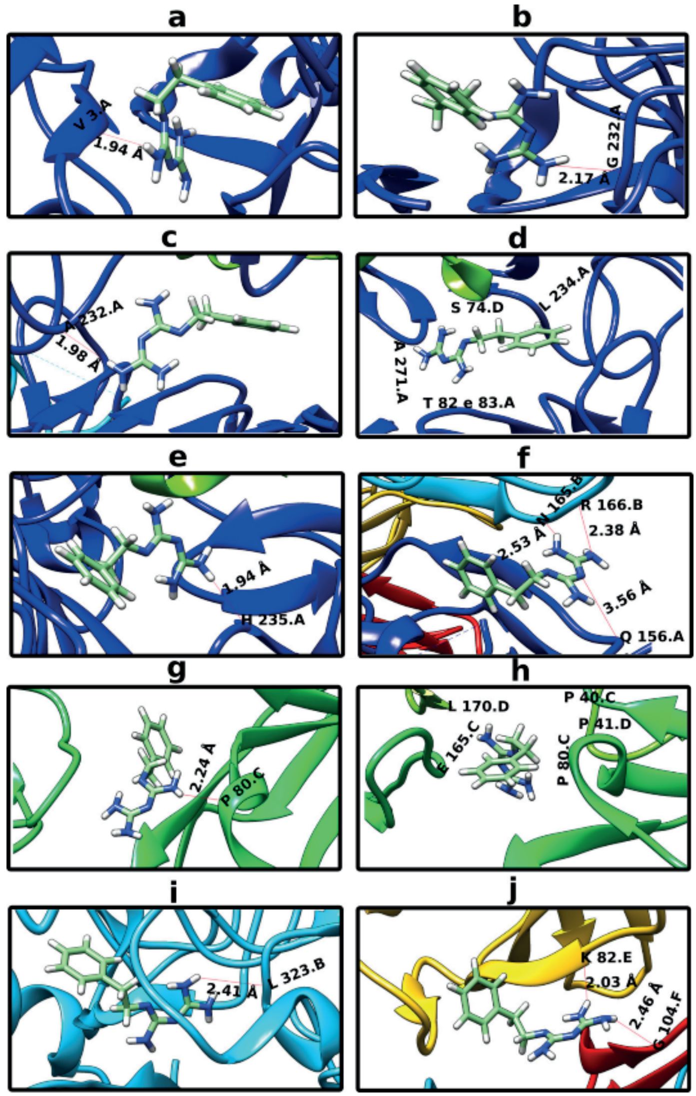


Figura 7: Regiões de ajuste do *docking* entre a fenformina e a proteína ErbB2 em ordem alfabética.

CONCLUSÕES

Neste trabalho estudamos as propriedades eletrônicas, estruturais, vibracionais, ópticas e a afinidade da ligação entre ErbB2/fenformina a partir dos métodos, DFT/B3LYP-GGA/6-31+G(d,p) e PCM/SCRF.

Os cálculos relacionados aos mapas de potencial eletrostático mostraram que ao redor dos átomos de nitrogênio (=NH e -NH_2) há predominância de cargas elétricas negativas e entre as ligações dos átomos de hidrogênio com nitrogênio (NH) cargas elétricas positivas.

Os espectros UV-Vis e IR calculados em ambiente aquoso mostraram deslocamentos das transições eletrônicas em direção a altas frequências.

A ligação espontânea entre a fenformina e a proteína ErbB2 observada no cálculo de *docking molecular* mostrou que as biguanidas podem ser utilizadas como possíveis inibidores do crescimento de células de câncer de mama.

O valor estimado da energia de *band gap* relacionada aos orbitais moleculares de fronteira, HOMO-LUMO, mostrou que a fenformina possui um largo *band gap* indicando que o material é estável e isolante.

Nossos resultados mostraram que é urgente uma investigação teórica-experimental mais aprofundada das propriedades da fenformina para ser utilizada como medicamento anticancerígeno.

REFERÊNCIAS

1. Kathuria, D.; Bankar, A. A.; Bharatam, P. V.; **"what's in a structure?"** the story of biguanides, Journal of Molecular Structure 1152 (2018) 61–78. doi:10.1016/j.molstruc.2017.08.100.

2. García Rubiño, M. E.; Carrillo, E.; Ruiz Alcalá, G.; Domínguez-Martín, A.; Marchal, J. A.; Boulaiz, H.; **Phenformin as an anticancer agent: Challenges and prospects**, International Journal of Molecular Sciences 20 (13) (2019). doi:10.3390/ijms20133316.

3. Caraci, F.; *at al.*; **Effects of phenformin on the proliferation of human tumor cell lines**, Life Sciences 74 (5) (2003) 643–650. doi:10.1016/j.lfs. 2003.07.015.

4. Martins, I.; Rosa, H. V. D.; **Considerações toxicológicas da exposição ocupacional aos fármacos antineoplásicos**, Revista brasileira Medina do trabalho 2 (2004) 118–125. doi:http://www.rbmt.org.br/about-the-authors/201/pt-BR.

5. Rocha, F. L. R.; Marziale, M. H. P.; Robazzi, M. L. d. C. C.; **Perigos potenciais a que estão expostos os trabalhadores de enfermagem na manipulação de quimioterápicos antineoplásicos: conhecê-los para preveni-los**, Revista Latino-Americana de Enfermagem 12 (3) (2004) 511–517. doi:10.1590/S0104-11692004000300009.

6. Katiyar, C.; Gupta, A.; Kanjilal, S.; Katiyar, S.; **Drug discovery from plant sources: An integrated approach, AYU** (An international quarterly journal of research in Ayurveda) 33 (1) (2012) 10–19. doi:10.4103/0974-8520.100295.

7. Cui, W.; Aouidate, A.; Wang, S.; Yu, Q.; Li, Y.; Yuan, S.; **Discovering anticancer drugs via computational methods**, Frontiers in Pharmacology 11 (2020). doi:10.3389/fphar.2020.00733.

8. Krishnamurthy, S.; Ng, V. W.; Gao, S.; Tan, M.-H.; Yang, Y. Y.; **Phenforminloaded polymeric micelles for targeting both cancer cells and cancer stem cells in vitro and in vivo**, Biomaterials 35 (33) (2014) 9177–9186. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.07.018.

9. Guo, Z.; Zhao, M.; Howard, E. W.; Zhao, Q.; Parris, A. B.; Ma, Z.; Yang, X.; **Phenformin inhibits growth and epithelial-mesenchymal transition of erbb2-overexpressing breast cancer cells through targeting the igf1r pathway**, Oncotarget 8 (36) (2017) 60342. doi:10.18632/oncotarget.19466.

10. Becke, A. D.; **Density-functional exchange-energy approximation with correctasymptotic behavior**, Phys. Rev. A 38 (1988) 3098–3100. doi: 10.1103/PhysRevA.38.3098.

11. Miehlich, B.; Savin, A.; Stoll, H.; Preuss, H.; **Results obtained with the correlation energy density functionals of becke and lee, yang and parr**, Chemical Physics Letters 157 (3) (1989) 200–206. doi:10.1016/0009-2614(89) 87234-3.

12. Hanwell, M. D.; At. al.; **Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform**, Journal of cheminformatics 4 (2012) 1–17. doi:10.1186/1758 2946-4-17.

13. Frisch, M. J.; At. al., **Gaussian 09** (2009).

14. Mennucci, B.; At. al.; **Polarizable continuum model (pcm) calculations of solvent effects on optical rotations of chiral molecules**, The Journal of Physical Chemistry A 106 (25) (2002) 6102–6113. doi:10.1021/ jp020124t.

15. Rauhut, G.; Clark, T.; Steinke, T.; **A numerical self-consistent reaction field (scrf) model for ground and excited states in nddo-based methods**, Journal of the American Chemical Society 115 (20) (1993) 9174–9181. doi:10. 1021/ja00073a036.

16. Franklin, M. C.; Carey, K. D.; Vajdos, F. F.; Leahy, D. J.; De Vos, A. M.; Sliwkowski, M. X.; **Insights into erbb signaling from the structure of the erbb2-pertuzumab complex**, Cancer cell 5 (4) (2004) 317–328. doi:10. 1021/ja00073a036.

17. Berman, H. M.; *At. al.*; **The protein data bank**, Nucleic Acids Research 28 (1) (2000) 235–242. doi:10.1093/nar/28.1.235.

18. Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E.; **Ucsf chimera—a visualization system for exploratory research and analysis**, Journal of Computational Chemistry 25 (13) (2004) 1605–1612. doi:10.1002/jcc.20084.

19. Trott, O.; Olson, A. J.; **Autodock vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function**, efficient optimization, and multithreading, Journal of Computational Chemistry 31 (2) (2010) 455–461. doi:10.1002/jcc.21334.

20. Jakalian, A.; Jack, D. B.; Bayly, C. I.; **Fast, efficient generation of highquality atomic charges. am1-bcc model: Ii. parameterization and validation**, Journal of Computational Chemistry 23 (16) (2002) 1623–1641. doi:10.1002/jcc.10128.

21. Gasteiger, J.; Marsili, M.; **Iterative partial equalization of orbital electronegativity—a rapid access to atomic charges**, Tetrahedron 36 (22) (1980) 3219– 3228. doi:10.1016/0040-4020(80)80168-2.

22. Bedier, R.; Yousef, T.; Abu El-Reash, G.; El-Gammal, O.; **Synthesis, structural, optical band gap and biological studies on iron (iii), nickel (ii), zinc (ii) and mercury (ii) complexes of benzyl α-monoxime pyridyl thiosemicarbazone**, Journal of Molecular Structure 1139 (2017) 436–446. doi: 10.1016/j.molstruc.2017.03.054.

23. Feng, D.; Losovyj, Y.; Tai, Y.; Zharnikov, M.; Dowben, P.; **Engineering of the electronic structure in an aromatic dithiol monomolecular organic insulator**, J. Mater. Chem. 16 (2006) 4343–4347. doi:10.1039/B609217A.

24. Janaki, C.; Sailatha, E.; Gunasekaran, S.; R. Kumaar, G.; **Molecular structure and spectroscopic characterization of metformin with experimental techniques and dft quantum chemical calculations, International** Journal of TechnoChem Research 2 (2) (2016) 91–104. doi:https:// technochemsai. com/home/article_abstract/48.

25. Beaula, T. J.; Muthuraja, P.; Sethuram, M.; Dhandapani, M.; Rastogi, V.; B. Jothy, V.; **Biological and spectral studies of o-tolyl biguanide: Experimental and theoretical approach**, Journal of Molecular Structure 1128 (2017) 290–299. doi:10.1016/j.molstruc.2016.08.060.

26. Wiley, J.; **Sons, Inc. spectrabase** (2021). URL https://spectrabase.com/

27. Kirchmair, J.; Markt, P.; Distinto, S.; Wolber, G.; Langer, T.; **Evaluation of the performance of 3d virtual screening protocols: Rmsd comparisons, enrichment assessments, and decoy selection—what can we learn from earlier mistakes?**, Journal of Computer-Aided Molecular Design 22 (3) (2008) 213–228. doi:10.1007/s10822-007-9163-6.

ROSANGELA DALA POSSA - Graduada em controle de processos Químicos pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), mestre em Engenharia Química pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) e doutora em Engenharia Química pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). Professora Adjunta da Faculdade de Química e professora permanente do mestrado acadêmica em Química da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará da Unifesspa. Atua como coordenadora do programa de pós-graduação em Química (PPGQ) no biênio 2024-2026. Na pesquisa coordena um grupo que atua na remoção de poluentes por meio da adsorção, utilizando biomassas da Amazônia.

SIDNEI CERQUEIRA DOS SANTOS - Graduado em Ciências Biológicas pela Universidade Católica do Salvador (UCSal), especialista em Microbiologia pela Universidade Federal da Bahia (UFBA), mestre em Biotecnologia pela Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) e doutor em Biotecnologia pela Universidade Estadual do Ceará (UECE), com período sanduíche na Wageningen University (WUR), Holanda. Professor Adjunto do curso de graduação em Ciências Biológicas e do mestrado acadêmica em Química da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará (Unifesspa), atuando principalmente nos seguintes temas: atividade antimicrobiana, prospecção e processos microbianos com potencial biotecnológico, prospecção tecnológica e soluções estratégicas para resíduos da região amazônica. Foi Diretor-Geral do Instituto de Estudos em Saúde e Biológicas (2017-2021) da Unifesspa. Sócio fundador da startup SCS Sustainability & Innovation. Coordena projetos de pesquisa envolvendo o desenvolvimento de produtos e processos sustentável e inovador a partir de insumos da biodiversidade amazônica, fomentados por diferentes agências de fomento nacionais e regionais.

CARACTERIZAÇÃO, PROPRIEDADES E APLICAÇÕES DE COMPOSTOS (BIO)QUÍMICOS

www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br
@atenaeditora
www.facebook.com/atenaeditora.com.br

Atena Editora
Ano 2024

CARACTERIZAÇÃO, PROPRIEDADES E APLICAÇÕES DE COMPOSTOS (BIO)QUÍMICOS

www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br
@atenaeditora
www.facebook.com/atenaeditora.com.br

Atena Editora
Ano 2024